

Universität
Rostock



Traditio et Innovatio



Universitätsmedizin
Rostock

Aus dem Oscar Langendorff Institut für Physiologie der Universität Rostock

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Rüdiger Köhling

In vitro Untersuchung der Auswirkungen von *Low intensity focused ultrasound* (LIFU) auf die Spontanaktivität der
Pyramidenzellen der
hippocampalen CA1-Region

Inauguraldissertation zur Erlangung des
akademischen Grades
Doktor der Medizin
der
Universitätsmedizin Rostock

Vorgelegt von
Juliane Sophie Becker
aus Zweibrücken

Rostock, 14.07.2021

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00003202

Datum der Verteidigung: 14.07.2021

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Rüdiger Köhling, Universität Rostock, Oscar Langendorff Institut für Physiologie

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Andreas Wree, Universität Rostock, Institut für Anatomie

3. Gutachter: Prof. Dr. med. Ulrich Stephani, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Medizinische Fakultät

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	5
Thesen	8
1 Einleitung	10
1.1 Temporallappenepilepsien – neuroanatomische und histologische Grundlagen.....	10
2 Biophysikalische Grundlagen	22
2.1 Ultraschall	22
2.2 Oszillationen.....	25
3 Zielstellung der Arbeit.....	32
4 Material und Methoden	34
4.1 Material	34
4.1.1 Chemikalien	34
4.1.2 Ein- und Mehrwegmaterial.....	35
4.1.3 Geräte	36
4.1.4 Versuchstiere	37
4.1.5 Lösungen	37
4.2 Methoden.....	39
4.2.1 Präparation der hippocampalen Schnitte.....	39
4.2.2 Aufbau des elektrophysiologischen Messplatzes	40
4.2.3 Verwendete Stimulationsmuster	44
4.2.4 Extrazelluläre Ableitung.....	45
4.2.5 Intrazelluläre Ableitung.....	49
4.3 Auswertung und Statistik	56
4.3.1 Auswahl und Statistik der Spontanaktivität	56
4.3.2 Auswahl und Statistik der Doppelpulsstimulation	58
4.3.3 Auswahl und Auswertung der Strom-Spannungs-Sprünge.....	58
4.3.4 Auswahl und Auswertung der Schwellenpotentiale.....	62

5	Ergebnisse	64
5.1	Extrazelluläre Ableitung.....	64
5.1.1	Extrazelluläre Ableitung der Spontanaktivität	64
5.1.2	Doppelpulsstimulation	69
5.2	Intrazelluläre Ableitung.....	74
5.2.1	Passive Membraneigenschaften	74
5.2.2	Schwellenpotential	95
6	Diskussion	102
7	Zusammenfassung.....	114
	Abbildungsverzeichnis	116
	Tabellenverzeichnis	128
	Literaturverzeichnis.....	130
	Danksagung	138

Thesen

- 1) *Low intensity focused ultrasound* (LIFU) ist Gegenstand derzeitiger Forschung und gilt als mögliche nichtinvasive Therapieoption der (medikamentenrefraktären) Temporallappenepilepsien.
- 2) Verschiedene oszillatorische Mechanismen bilden die Grundlage unserer Gedächtnisbildung und können durch Ultraschall-Applikation im niedrigen Intensitätsbereich (hier: 480 mW/cm²) beeinflusst werden.
- 3) Delta-Oszillationen (0,5 – 3 Hz) sind keiner spezifischen Zellgruppe zuzuordnen und treten besonders während der verschiedenen Schlafphasen auf, während Gamma-Oszillationen (25 – 100 Hz) in *langsame*, *mittelschnelle* und *schnelle* Oszillationen eingeteilt werden und besonders den Interneuronen zuzuordnen sind.
- 4) Die hier durchgeführten Messungen zeigen, dass durch die Applikation von LIFU mit einer Repetitionsrate im Delta- und Gamma-Frequenzbereich die verschiedenen oszillatorischen Mechanismen unterschiedlich gut beeinflusst werden können, wobei eine Repetitionsrate im Bereich der Delta-Frequenz zu einem allgemeinen Ansprechen der Zellen führt, während eine Repetitionsrate im Bereich der Gamma-Frequenz vorrangig die Interneuronen anregt.
- 5) LIFU mit einer Repetitionsrate im Delta-Frequenzbereich bewirkt eine signifikante Verminderung der extrazellulär zu messenden spontanen Entladungen, während in der Gamma-Gruppe sowohl eine Zu- als auch eine Abnahme der spontanen Aktivität beobachtet werden kann.
- 6) Die Zunahme an spontanen Einzelentladungen im Bereich des Gamma-Protokolls nach LIFU korreliert mit einer Zunahme des Spannungseinbruchs, wie er in den intrazellulären Messungen nachgewiesen werden konnte.
- 7) LIFU zeigt keine Wirkung auf die synaptische Übertragung via Schaffer-Kollateralen, wobei eine veränderte Konzentration von Neurotransmittern jedoch nachgewiesen ist und zukünftig weiter untersucht werden sollte.
- 8) Die Untersuchung der passiven und aktiven Membraneigenschaften der Zellen zeigt eine zunehmende Stabilität des Zellsystems nach LIFU mit einer Repetitionsrate besonders im Delta-Frequenzbereich im Vergleich zur Kontrollgruppe, die sich u.a. in einer Stabilität des Schwellwertpotentials der Delta-Gruppe äußert, während sich in der Kontrolle Hinweise auf eine zunehmende Membrandurchlässigkeit häufen.

1 Einleitung

Der Begriff „limbisches System“ beschreibt in seiner ursprünglichen Bedeutung Gehirnteile, die sich saumartig um den Balken und das Zwischenhirn legen [1]. Heute wird der Begriff auch übergeordnet für die Emotionslokalisation im Säugetiergehirn verwendet [1]. In der Regel werden folgende Strukturen dem limbischen System zugeordnet [1]:

- *Hippocampus (einschließlich Gyrus dentatus und Fornix)*
- *Gyrus cinguli*
- *Gyrus parahippocampalis mit Area entorhinalis*
- *Corpus amygdaloideum*
- *Corpus mammillare*
- *große Teile des Riechhirns einschließlich der Septumregion*
- *Indusium griseum*
- *Thalamusanteile*

In der nachfolgenden Arbeit soll besonders auf den Hippocampus sowie seine Bedeutung im Rahmen der Temporallappenepilepsien näher eingegangen werden. Auf die übrigen Strukturen wird lediglich im Rahmen der zu Grunde liegenden Verschaltungen verwiesen.

1.1 Temporallappenepilepsien – neuroanatomische und histologische Grundlagen

Der Hippocampus (lat. Seepferdchen) liegt tief im medialen Temporallappen des menschlichen Gehirns und spielt eine wesentliche Rolle in der Gedächtnisbildung [1]. Auf der Basis eines räumlich-zeitlichen Netzwerkes stellt er die Verbindungsstelle zwischen sensorischen, emotionalen und kognitiven Wahrnehmungen dar. Diese werden gespeichert und können bei Gelegenheit als bewusste Erinnerung wieder wahrgenommen werden [1].

Die diesem Mechanismus zu Grunde liegende neuroanatomische Verschaltung ist in der folgenden Abbildung 1 vereinfacht dargestellt. Sie zeigt den charakteristischen „trisynaptischen Schaltkreis“ [2]–[4].

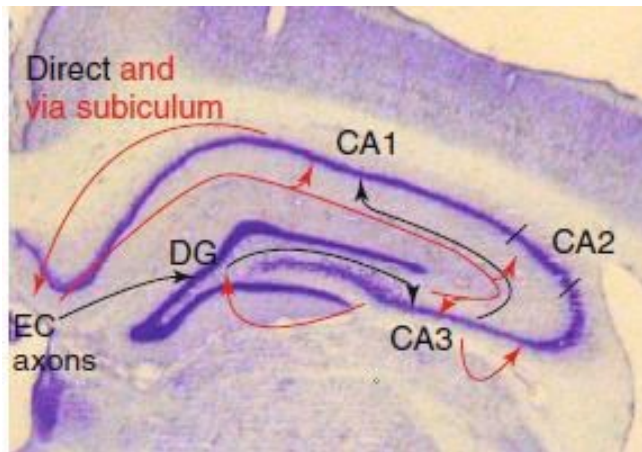


Abbildung 1: trisynaptischer Schaltkreis. Die schwarzen Pfeile der Abbildung stellen die charakteristische Verschaltung des trisynaptischen Schaltkreises dar, der in einer 1. Synapse vom entorhinalen Cortex über den tractus perforans zum Gyrus dentatus projiziert. Von hier besteht in einer 2. Synapse über die sog. Moosfasern eine Verbindung zur CA3-Region des hippocampalen Netzwerkes. Die sogenannten Schaffer-Kollaterale projizieren in einer 3. Synapse von der CA3- auf die CA1-Region. Diese baut wiederum rückläufig eine Verbindung zum entorhinalen Cortex auf und schließt dadurch die charakteristische Verschaltung über diesen Regelkreis. Die roten Pfeile stellen vereinfacht weitere wichtige Alternativen in der Verschaltung des Hippocampus dar. Hierzu gehören unter anderem die direkte Verbindung des entorhinalen Cortex zu allen drei CA-Regionen des Hippocampus, die Rückkopplung über das Subiculum zum entorhinalen Cortex, die zusätzliche rückläufige Verbindung von CA3 zu CA2 sowie die Feedback-Verschaltung zwischen CA3 und Gyrus dentatus (Bild aus [3], Fig. 1).

Wie in Abbildung 1 deutlich wird, basiert der Informationsfluss im Bereich des Hippocampus vor allem auf der Abfolge „Gyrus dentatus (wesentliches afferentes System des Hippocampus) → Cornu ammonis → Subiculum (wesentliches efferentes System des Hippocampus) → Fornix“ [1]. Ein Großteil der Information wird hierbei vom entorhinalen Cortex an den Hippocampus geliefert [3], [5]. Dessen Fasern projizieren über den tractus perforans auf den Gyrus dentatus (1. Synapse). Der Gyrus dentatus wiederum projiziert über Moosfasern auf die CA3-Region des hippocampalen Netzwerkes (2. Synapse). Diese nimmt über die sogenannten Schaffer-Kollaterale Verbindung zur CA1-Region auf (3. Synapse). Deren Verknüpfung mit dem entorhinalen Cortex schließt die Schleife der neuroanatomischen Verschaltung (vgl. Abbildung 1) [3].

Störungen im Ablauf dieser physiologischen Verknüpfung und Informationsverarbeitung fin-

den sich bei zahlreichen Erkrankungen wie beispielsweise dem Morbus Alzheimer, der Schizophrenie sowie Erkrankungen des epileptischen Formenkreises [6], [7]. Durch die Weiterentwicklung von Pharmaka ist es gelungen, einige dieser Krankheiten mit Auswirkungen auf die Informationsverarbeitung im Bereich des Hippocampus zum Teil medikamentös einzudämmen. Ein Ansprechen der Therapie kann hierbei jedoch oft nicht sicher gewährleistet werden und so ist besonders auch bei den Temporallappenepilepsien die chirurgische Entfernung des betroffenen Areals eine bis heute häufig durchgeführte Alternative [8]–[11]. Die Risiken einer solchen Temporallappenteilresektion werden u.a. an der von 1957 stammenden Fallstudie zum „Patient HM“ deutlich [12]. Dieser litt nach beidseitiger chirurgischer Entfernung des Hippocampus und angrenzender Strukturen des Temporallappens zur Therapie einer medikamentenrefraktären Epilepsie unter einer retrograden Amnesie. Diese betraf besonders die Jahre direkt vor der Operation und das Kurzzeitgedächtnis. Angaben zur eigenen Person sowie der familiären und sozialen Herkunft waren weiterhin möglich [12].

Neben der chirurgischen Entfernung des betroffenen Gehirnareals gelten auch die Vagusnervstimulation sowie die tiefe Hirnstimulation als mögliche Therapieoptionen der medikamentenrefraktären Epilepsien [9], [13], [14]. Diese stellen jedoch ebenfalls invasive Eingriffe mit den entsprechenden Risiken dar. Auch die transkranielle Magnetstimulation sowie die transkranielle Gleichstromstimulation wurden als mögliche nicht-invasive Therapieoptionen der Temporallappenepilepsien in Betracht gezogen [15]. Durch ihre oszillatorischen Mechanismen können sie die Aktivität von Hirnzellen positiv bzw. negativ beeinflussen. Allerdings besitzen sie eine mangelnde Tiefenpenetration sowie eine relativ breite Verteilungsoberfläche [15]. Dies führt auch zur Beeinträchtigung benachbart gelegener Gehirnareale mit möglichen unerwünschten Nebeneffekten. Hierzu gehört u.a. die Auslösung iktaler Ereignisse im gesunden umliegenden Gewebe [16]. Neue wissenschaftliche Studien zeigen, dass Ultraschall durch seine variierende Eindringtiefe sowie lokale Wirkung, die auf die maximale Größe eines Reiskorns reduziert werden kann [16], diesen Einschränkungen überlegen scheint [17]–[19]. Aufgrund dieser Vorzüge ist er Gegenstand derzeitiger Forschung mit dem erklärten Ziel neue, nicht-invasive Therapiemöglichkeiten im Bereich der Temporallappenepilepsien zu entwickeln [8], [17], [18].

Grundlage dieses wissenschaftlichen Ansatzes ist die ausgeprägte interneuronale Verschaltung des Gehirns [1], [20], [21], die durch zahlreiche oszillatorische Mechanismen die Gedächtnisbildung aufrecht erhält [22], [23]. Donald Olding Hebb hat in diesem Zusammenhang 1949 die sog. Hebb'sche Lernregel formuliert [24], [25]:

„Wenn ein Axon des Neurons A nahe genug an einem Neuron B liegt, sodass Zelle B wiederholt oder anhaltend von Neuron A erregt wird, so wird die Effizienz von Neuron A für die Erregung von Neuron B durch einen Wachstumsprozess oder eine Stoffwechseländerung in beiden oder einem der beiden Neuronen erhöht.“ (deutsche Übersetzung aus [20]).

Die in diesem Zitat beschriebene neuronale Plastizität umfasst die Fähigkeit von Nervenzellen, durch Training neue Assoziationen auszubilden. Dies geschieht auf Grundlage variierender synaptischer Transmitterausschüttung, der Veränderung und Modulation von Interneuronen, der Bildung neuer Synapsen sowie der Reorganisation des synaptischen Einstroms [20]. Hierbei reagieren Nervenzellen nicht nur auf einen extern applizierten Reiz im Rahmen der synaptischen Plastizität [26], sondern auch bei ausbleibendem sensorischem Stimulus zeigt sich eine dauerhafte oszillatorische Eigenfrequenz [27], [28]. Die rhythmische Gruppierung dieser einzelnen Entladungen wird vom Zentralnervensystem als Information wahrgenommen [20].

Der beständige, synchronisierte Wechsel zwischen Phasen vermehrter synaptischer Aktivität (*upstates*) sowie relativer Stille (*downstates*), der sich u.a. im Schlaf oder in Narkose nachweisen lässt, bildet hierbei eine wesentliche Grundlage [4], [29]. Er zeigt eine inverse Beziehung zwischen der Größe des integrierten Gehirnareals sowie der vorherrschenden Frequenz [20], [30]: Die lokale sensorische Integration basiert im Wesentlichen auf Oszillationen im Gamma-Frequenzbereich (25 – 100 Hz), während die multisensorische Integration hauptsächlich durch Frequenzen im Beta-Bereich (12 – 18 Hz) widerspiegelt wird. *Top-down Prozesse*, die sich über große Bereiche des Säugetiergehirns erstrecken und mehrere funktionelle und biophysikalische Prozesse umschließen, entwickeln sich hauptsächlich im langsamen Frequenzbereich des Theta- und Alpha-Rhythmus (4 -12 Hz) [30]. Sie dienen der gezielten und selektiven Aufmerksamkeit und werden durch zentrale Bewertung und selektive Auswahl des Säugetiergehirns aus der Umgebung bestimmt [20]. Dem gegenüber stehen die sogenannten *bottom-up Prozesse*, die eine automatisierte Aufmerksamkeit widerspiegeln. Letztere äußern sich durch Entladungen, hauptsächlich im Gammafrequenzbereich [30], [31], wobei eine periphere Reizsituation zentral an das Gehirn gemeldet wird und eine automatisierte Antwort hervorruft. Diese basiert im Wesentlichen auf einem zuvor gespeicherten Reiz-Reaktions-Muster oder der jeweilige Stimulus übertrifft in seiner Intensität alle anderen einwirkenden Reize (Salienz) [20]. Der beständige Wechsel aus Phasen verstärkter Aktivität und Phasen der Ruhe lässt sich auch durch EEG-Ableitungen u.a. an der Kopfoberfläche von Menschen messen und durch extern gesetzte Stimuli beeinflussen [20]. Die hier gemessenen Wellen bestehen aus der

Summe der elektrischen Feldpotentiale von kortikalen Neuronen. Durch die parallele Ausrichtung einiger ihrer Dendriten können sie postsynaptische dendritische Ströme evozieren, die durch lotrecht am Skalp angebrachte Elektroden abgeleitet werden können [30]. Nach derzeitigen Schätzungen leitet hierbei eine etwa 1 mm² große Elektrodenfläche die Potentialschwankungen von rund 100 000 Neuronen in einer Tiefe von bis zu 0,5 mm ab [20]. Der Wechsel aus Synchronisation und Desynchronisation der bestehenden oszillatorischen neuronalen Eigenschaften kann so im laufenden EEG abgebildet werden [30].

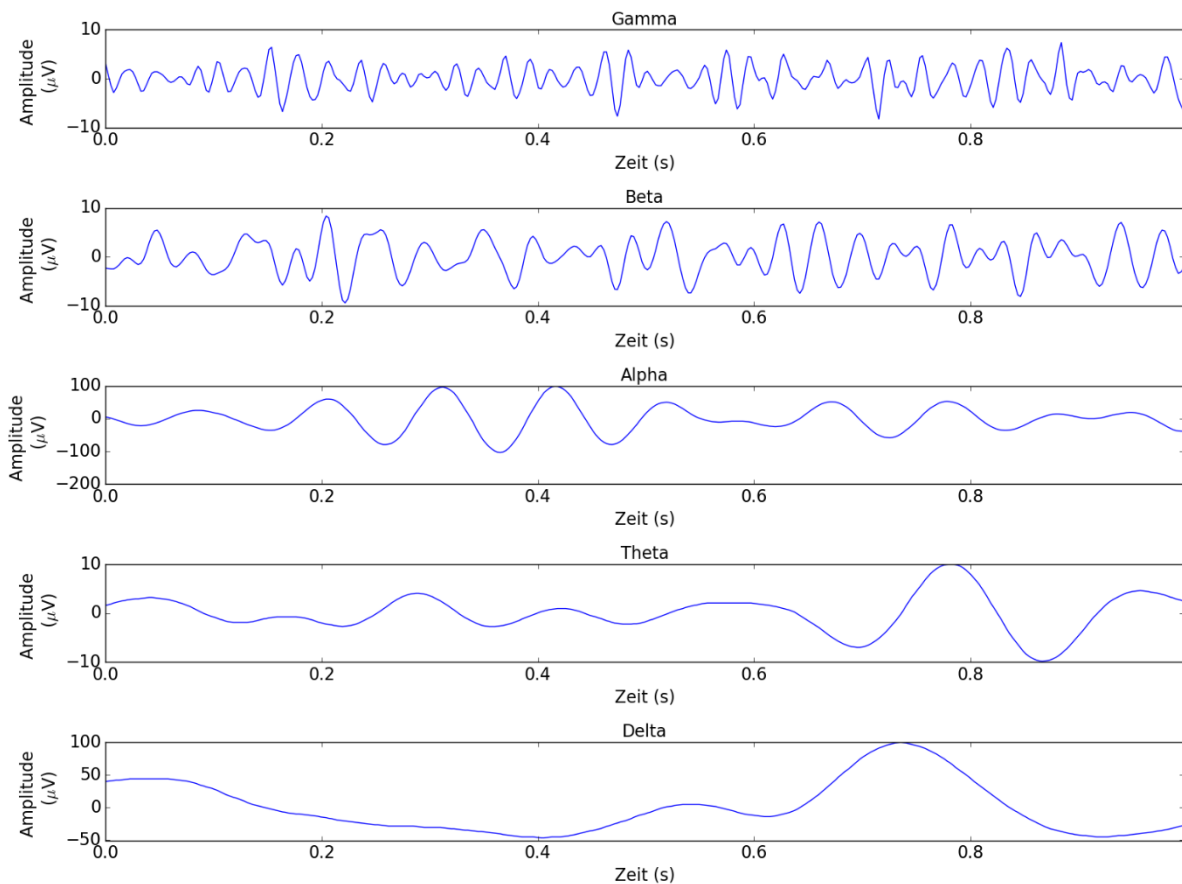


Abbildung 2: EEG-Beispielspuren verschiedener Frequenzbereiche. Im EEG abgeleitete Wellen können vorrangig fünf Frequenzbereichen zugeordnet werden. Dies sind von oben nach unten: Gamma-, Beta-, Alpha-, Theta und Delta-Wellen. Gamma-Wellen sind häufig im abgeleiteten EEG sehr klein und mit bloßem Auge nicht zu erkennen [20], [32]. In der hier gezeigten Abbildung findet sich daher eine vergrößerte Darstellung. Abbildung in Anlehnung an [33].

Veränderungen im Sinne der synaptischen Plastizität können jedoch auch einen krankhaften Prozess als Ursache haben. Hierbei sollen Pyramidenzellen, die eine oszillatorische Eigenfrequenz im Theta-Bereich (4 – 7 Hz) aufweisen, maßgeblich an der Generierung der Temporallappenepilepsien beteiligt sein [34]. Temporallappenepilepsien führen zu einem Ungleichgewicht an exzitatorischen und inhibitorischen Kräften und resultierend zu einer übermäßigen Erregung der hippocampalen Pyramidenzellen [35]–[38]. Dieses Ungleichgewicht basiert zum Teil auf der funktionellen Verknüpfung zwischen den verschiedenen interneuronalen Zellen und den Pyramidenzellen [39], wie sie in der folgenden Abbildung 3 schematisch dargestellt ist:

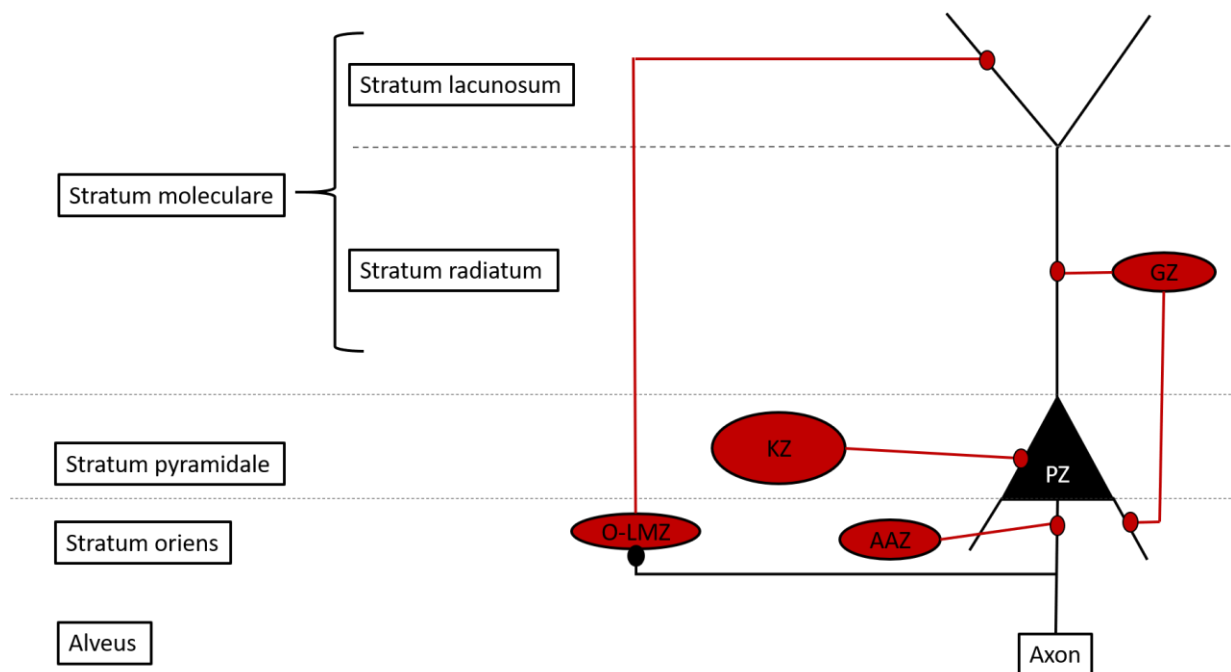


Abbildung 3: Übersichtszeichnung des histologischen Aufbaus des Archicortex, dessen größter Anteil vom Hippocampus gebildet wird. Dargestellt ist die neuroanatomisch-histologische Verschaltung zwischen exzitatorischen (schwarz) und inhibitorischen (rot) Zellen im Bereich der hippocampalen CA1-Region. Die Faserschicht des Alveus liegt dem Archicortex des Ammonshorns unmittelbar auf. Sie führt afferente und efferente Fasern des Hippocampus und geht über die Fimbria hippocampi in den Fornix über (nicht dargestellt). Nach innen folgen die drei klassischen Schichten des Archicortex: Stratum oriens als Körbzelleschicht (hier dargestellt mit zwei Vertretern dieser Gruppe, den Oriens-lacunum-moleculare Zellen, sowie den Axi-axonalen Zellen), Stratum pyramidale als Pyramidenzellschicht, mit vor allem großen erregenden glutamatergen Neuronen und das

*Stratum moleculare, das sich aufteilt in ein Stratum radiatum sowie ein Stratum lacunosum. Das Soma der exzitatorischen Pyramidenzellen ist hauptsächlich im Stratum pyramidale lokalisiert. Ihre distal apikalen Dendriten reichen bis ins Stratum lacunosum moleculare. Dort werden sie durch die inhibitorische Wirkung von Somatostatin positiven Oriens-lacunosum-moleculare Zellen beeinflusst. Diese haben ihre Zellkörper vorwiegend im Stratum oriens lokalisiert. Die apikalen und basalen Dendriten der hippocampalen Pyramidenzellen der CA1-Region unterstehen dem inhibitorischen Einfluss von Somatostatin positiven Ganglienzellen, deren Zellkörper im Stratum oriens, radiatum oder pyramidale vorzufinden sind. Das Axoninitialsegment der Pyramidenzellen steht in direktem synaptischem Austausch zu Axo-axonalen Zellen. Das Soma selbst sowie die proximalen Dendriten, werden im Bereich des Stratum pyramidale und radiatum durch inhibitorische Einflüsse von parvalbuminpositiven Korbzellen beeinflusst. **KZ**: Korbzellen; **GZ**: Ganglienzellen; **PZ**: Pyramidenzelle; **O-LMZ**: Oriens-lacunosum-moleculare Zellen; **AAZ**: Axo-axonale Zellen. In Anlehnung an [40].*

Abbildung 3 zeigt eine Übersichtszeichnung des histologischen Aufbaus des Archicortex, dessen größter Anteil vom Hippocampus gebildet wird [1], [40]. Da sich der Cortex im Bereich des Ammonshorns einrollt und auch der Cortex des Gyrus dentatus mit erfasst wird, liegen zum Teil mehrere Dreierschichten des Archicortex übereinander [1].

Die Faserschicht des *Alveus* liegt dem Archicortex des Ammonshorns unmittelbar auf. Sie führt afferente und efferente Fasern des Hippocampus und geht über die Fimbria hippocampi in den *Fornix* über (nicht dargestellt in Abbildung 3). An den *Alveus* anschließend folgen nach innen die drei klassischen Schichten des Archicortex: *Stratum oriens* als Korbzellschicht (hier dargestellt mit zwei Vertretern dieser Gruppe, den Oriens-lacunosum-moleculare Zellen, auch Kandelier-Zellen genannt, sowie den Axo-axonalen Zellen), *Stratum pyramidale* als Pyramidenzellschicht, mit vor allem großen erregenden glutamatergen Neuronen und das *Stratum moleculare*, das sich aufteilt in ein *Stratum radiatum* sowie ein *Stratum lacunosum*. Letztgenannte Schicht wird häufig auch als *Stratum radiatum-lacunosum-moleculare* bezeichnet. Hier erfolgt hauptsächlich die interneuronale Verschaltung zwischen den Pyramidenzellen sowie den Korbzellen [1], [40].

Der dargestellte histologische Aufbau lässt Rückschlüsse auf die zu Grunde liegende Verschaltung der jeweiligen Zellen zu: Das Soma der exzitatorischen Pyramidenzellen ist hauptsächlich im *Stratum pyramidale* lokalisiert [40]. Ihre distal apikalen Dendriten reichen bis ins

Stratum lacunosum moleculare. Dort werden sie besonders durch den inhibitorischen Einstrom von Somatostatin positiven Oriens-lacunosum-moleculare Zellen beeinflusst [40]. Diese haben ihre Zellkörper vorwiegend im *Stratum oriens* lokalisiert [40]. Die apikalen und basalen Dendriten der hippocampalen Pyramidenzellen der CA1-Region unterstehen dem inhibitorischen Einfluss von Somatostatin positiven Ganglienzellen, deren Zellkörper im *Stratum oriens, radiatum oder pyramidale* vorzufinden sind [40]. Das Axoninitialsegment der Pyramidenzellen steht in direktem synaptischem Austausch zu Axo-axonalen Zellen, die über einen depolarisierenden Effekt vor allem das jeweilige Schwellenpotential und in diesem Zusammenhang den Informationsfluss beeinflussen [40], [41]. Das Soma selbst sowie die proximalen Dendriten, werden im Bereich des *Stratum pyramidale* und *radiatum* durch inhibitorische Einflüsse von parvalbuminpositiven Korbzellen beeinflusst. Diese regulieren über ihre synaptischen Verbindungen sowohl den erregenden und hemmenden Eingang als auch den Ausgang der Pyramidenzellen und tragen dadurch einen wichtigen Anteil an der Generierung geordneter Entladungen [5], [42].

Im Fall der Temporallappenepilepsien kommt es zu einem Ungleichgewicht dieser erregenden und hemmenden Einflüsse. Wie sich das jeweilige Gleichgewicht verschiebt, ist bisher nicht vollständig geklärt. Unter anderem wird die Degenerierung somatostatinbildender inhibitorischer Zellen an den Dendriten der Pyramidenzellen beschrieben [43]. Dies führt in Kombination mit dem vermehrten exzitatorischen Eingang zu einer Herabsetzung des Anfallsschwellenpotentials und bedingt u.a. eine übermäßige Aktivierung parvalbuminbildender inhibitorischer Zellen, die hauptsächlich am Soma der Pyramidenzellen ihre Synapsen ausbilden. Diese sollen über einen verstärkten inhibitorischen Eingang das verlorene Gleichgewicht zwischen Exzitation und Inhibition wiederherstellen. In den Temporallappenepilepsien ist dieses jedoch zu Gunsten der Exzitation verschoben [43]. In enger Korrelation steht hierbei auch der wissenschaftliche Nachweis einer veränderten Dichte und Sensibilität der GABA_A-Rezeptoren in hippocampalen Körnerzellen [10], [44], [45]. In ihrem Aufbau gleichen die Rezeptoren weitestgehend dem nicotinischen Acetylcholinrezeptor, der ebenfalls zu der Gruppe der ionotropen Rezeptoren gezählt wird [45]. Im Wesentlichen bestehen GABA_A-Rezeptoren aus einem heteropentameren Aufbau [45], [46], der sich im Bereich des Hippocampus vorrangig aus den Untereinheiten α_1 , α_2 , α_4 , α_5 , β_1 , β_3 , γ_2 und δ zusammensetzt [10], wobei jede der fünf Peptidketten viermal die jeweilige Membran durchquert [45]. Im Bereich der hippocampalen CA1-Region findet sich besonders eine Rezeptorkonstellation aus α_1 , α_2 oder α_5 und $\beta_x\gamma_2$ [10], [47]. Hierbei ermöglicht γ_2 die Bindung von Benzodiazepinen am GABA-Rezeptor [47]. Die ent-

sprechenden α Untereinheiten scheinen für den antikonvulsiven (α_1) bzw. anxiolytischen Effekt (α_2) ausschlaggebend zu sein [47].

Die Wirkung des (hippocampalen) GABAA-Rezeptors ist maßgeblich von der Reife des zu Grunde liegenden Gehirns abhängig. Durch die verspätete Bildung eines Chloridkanals, der Chloridionen von intrazellulär nach extrazellulär transportiert, wirken GABAA-Rezeptoren im unreifen Säugetiergehirn der hippocampalen Region zunächst aktivierend. Der Umschlag in einen hemmenden Effekt erfolgt erst mit zunehmender Reife und ist abhängig von der Bildung erregender glutamaterger Zellpopulationen [48]. Im reifen Säugetiergehirn bedingt eine Aktivierung des GABAA-Rezeptors einen inhibitorischen postsynaptischen Strom (IPSC) [47]. Dieser ist sowohl von der Verteilung und der Zusammensetzung der Rezeptoren abhängig, als auch von der Menge an freigesetztem Transmitter im synaptischen Spalt [47]. Hierbei unterscheidet man eine phasische (synaptische) Hemmung, die auf einen zeitlich begrenzten Überschuss des Neurotransmitters im Bereich des synaptischen Spaltes begrenzt ist, von einer tonischen Inhibition. Letztere zeichnet sich durch einen durchgehenden hemmenden Einfluss aus, der auf dem Vorkommen niedriger GABA-Konzentrationen im extrazellulären Spalt beruht [38], [47]. Dieser soll für die Regulation der zellulären Aktivität wesentlich sein [47]. Ob im Bereich des GABAA-Rezeptors vermehrt die Untereinheiten α_1 , α_2 oder α_5 zu finden sind, scheint vor allem durch die Verteilung der jeweiligen Rezeptoren bedingt zu sein [47]: Die α_2 Untereinheit findet sich besonders im Bereich von Synapsen des Axoninitialsegments, sowie an Synapsen des Zellkörpers, die auf parvalbuminnegativen Korbzellen beruhen. Parvalbuminpositive Korbzellen im Bereich des Somas von Pyramidenzellen innervieren hingegen vorrangig GABAA-Rezeptoren mit großen α_1 - und α_2 -Untereinheiten. Hierbei zeigt sich, dass Rezeptoren, die die α_2 Untereinheit bilden, langsamer deaktivieren als Rezeptoren, die vorrangig die α_1 Untereinheit beinhalten [47]. Auch das Vorkommen der Untereinheiten δ und γ scheint eng damit verbunden zu sein. Rezeptoren, die die γ Untereinheit exprimieren, scheinen schneller zu desensibilisieren bei verlängerter Deaktivierung im Vergleich zu Rezeptoren, die vorrangig die δ Untereinheit exprimieren [46], [47]. Im Bereich der Dendriten hippocampaler Zellen der CA1-Region findet sich eine verstärkte Expression der Untereinheiten α_2 und α_5 . Diese zeichnen sich vor allem durch die Generierung langsamer inhibitorischer postsynaptischer Ströme aus [47]. Auch durch Phosphorylierung kann Einfluss auf die entsprechenden GABAA-Rezeptoren genommen werden [47], [49]: Hierdurch kann die Aktivität der entsprechenden Rezeptoren gesteigert, bzw. ihre vordergründige Aktivität verstärkt werden [47], [49]. Im Krankheitsbild der Temporallappenepilepsien ist das Gleichgewicht dieser beschrie-

benen neurohistologischen Funktionsweise der GABAA-Rezeptoren gestört, sodass eine vermehrte postsynaptische Expression dieser Rezeptoren im Bereich des Somas und des Axoninitialsegments mit einer verminderten Sensitivität auf die jeweiligen Neurosteroidhormone einhergeht [10], [44]. Dies steht auch in engem Zusammenhang zu den Forschungsergebnissen von Karlócai et al. [39]. Dieser stellt dar, dass epileptische Aktivität auf der einen Seite zwar durch eine vermehrte Aktivität der Pyramidenzellen bedingt ist, diese aber im Wesentlichen auf einer Abnahme der perisomatischen Inhibition durch parvalbuminpositive Korbzellen sowie Axo-axonalen Zellen beruht. Auch Nusser et al. [44] konnte in seinen Experimenten nachweisen, dass eine vermehrte Expression der inhibitorischen GABAA-Rezeptoren im Bereich des Somas und des Axoninitialsegments mit einer verminderten Sensibilität einhergeht. Diese - sowie die zunehmende Empfindlichkeit der Zellen auf Zn^{2+} - scheinen wesentlich am Kollaps der perisomatischen Inhibition des epileptiformen Krankheitsbildes beteiligt zu sein [44]. Karlócai et al. [39] konnte das beschriebene Ungleichgewicht an hemmenden und erregenden Einflüssen besonders in den verschiedenen experimentellen Modellen nachweisen, die auf Grundlage von hohem Kalium, 4-Aminopyridin oder 0-Magnesium eine epileptische Aktivität induzieren. Im Gabazin-Modell ließ sich eine entsprechende neurophysiologisch-histologische Wirkung nicht nachweisen [39]. Ob auch eine aktivierende Wirkung des GABAA-Rezeptors [48], wie sie zuvor beschrieben worden ist, an der Generierung epileptischer Ereignisse beteiligt ist, ist bisher nicht geklärt.

Die Lage der Pyramidenzellen im Gewebe scheint ebenfalls Einfluss auf die Verschaltung zu nehmen. So konnte gezeigt werden, dass eine oberflächliche sowie eine tiefe Gruppe dieser Zellen zu unterscheiden ist. Inwieweit sich dies in der Verschaltung mit den parvalbuminpositiven Korbzellen widerspiegelt, ist in der folgenden Abbildung 4 vereinfacht dargestellt.

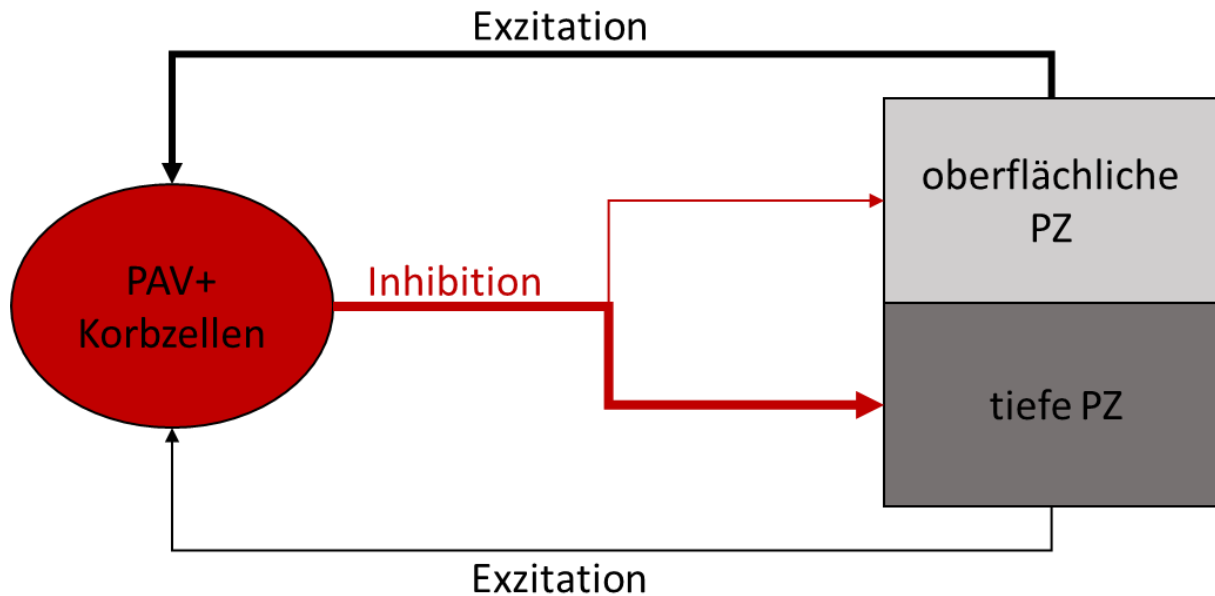


Abbildung 4: Schemazeichnung des Regelkreises zwischen parvalbuminpositiven (PAV+) Korbzellen und oberflächlichen sowie tiefen Pyramidenzellen (PZ). Wie in der Zeichnung durch die variierende Pfeildicke deutlich wird, erhalten die tief gelegenen Pyramidenzellen etwa 3x mehr inhibitorischen Eingang von den PAV+ Korbzellen als die oberflächlichen Pyramidenzellen. Umgekehrt gilt jedoch, dass die Erregung der PAV+ Korbzellen hauptsächlich von den oberflächlichen Pyramidenzellen ausgeht. Deren exzitatorische Synapsen zu den PAV+ Korbzellen sind etwa 3x stärker ausgeprägt als die der tiefen Pyramidenzellen. Demnach resultiert in der hippocampalen CA1-Region eine PAV+ Korbzellen-vermittelte feedforward Inhibition von oberflächlichen Pyramidenzellen zu tiefen Pyramidenzellen. Die Verknüpfungswahrscheinlichkeit sowie die Stärke des durch die PAV+ Korbzellen vermittelten inhibitorischen postsynaptischen Stroms ist unabhängig von der durch die Pyramidenzellen vermittelten Rückprojektion. Es besteht keine Feedback-Inhibition.

Wie in Abbildung 4 dargestellt, stehen die parvalbuminpositiven Korbzellen mit zwei unterschiedlichen Gruppen an Pyramidenzellen in Verbindung: den oberflächlichen Pyramidenzellen sowie den tiefer gelegenen Pyramidenzellen. Die inhibitorische Verbindung der parvalbuminpositiven Korbzellen zu den tiefen Pyramidenzellen ist 3x stärker ausgebildet als zu den oberflächlichen Pyramidenzellen. Im Gegenzug erhalten die parvalbuminpositiven Korbzellen jedoch im Sinne einer feedforward Inhibition 3x mehr exzitatorischen Einstrom aus den oberflächlichen Pyramidenzellen als aus den tiefen Pyramidenzellen. Die Verknüpfungswahrscheinlichkeit sowie die Stärke des durch die parvalbuminpositiven Korbzellen vermittelten

inhibitorisch postsynaptischen Stroms ist unabhängig von der durch die Pyramidenzellen vermittelten Rückprojektion [7].

Neben den parvalbuminpositiven Korbzellen bilden auch die cholecystokininpositiven Korbzellen einen wesentlichen Anteil an der persiomatischen Inhibition. Wie die parvalbuminpositiven Korbzellen zeigen auch sie eine lageabhängige Variation der Inhibitionsstärke [29]. Da sie in ihrer Lokalisation und Verteilung weitestgehend mit den parvalbuminpositiven Korbzellen übereinstimmen, wurde auf eine genauere Darstellung in Abbildung 4 verzichtet.

2 Biophysikalische Grundlagen

2.1 Ultraschall

Schallwellen basieren auf dem mechanischen Weitertransport von Energie von einer Quelle, z.B. den stimmungsbildenden Organen, zu einem Empfangsorgan, wie beispielsweise dem Ohr. Die Ausbreitung im Raum basiert hierbei auf der mechanischen Kopplung benachbarter, schwingungsfähiger Systeme [50]. Deren Masse und die Stärke der Kopplung sind für die Ausbreitungsgeschwindigkeit bestimmend [51], [52]. Sowohl in Flüssigkeiten als auch in Gasen breiten sich Wellen auf Grund des fehlenden Schermoduls nur in Form von Longitudinalwellen aus. Da biologisches Weichgewebe per Definition als zähe Flüssigkeit gilt, ist anzunehmen, dass die Schallausbreitung hier ebenfalls lediglich in Form von Longitudinalwellen geschieht [52]. Das Maximum des Wellenausschlags ereignet sich bei maximaler Kompression der Teilchen, während das Minimum zum Zeitpunkt der geringsten Krafteinwirkung auftritt. Ein Teil der transportierten Energie geht bei diesem Prozess in Form von Streuung, Reflexion und Wärme verloren [51]–[54].

Liegen die sogenannten Schallwellen in einem Frequenzbereich zwischen 20 Hz – 20 kHz sind sie für unser Gehör als akustische Laute wahrnehmbar. Darüber spricht man vom sog. Ultraschall [8], [54], [55].

Die verschiedenen Interaktionen des Ultraschalls mit biologischem Gewebe und ihre gegenseitige Beeinflussung ist Gegenstand derzeitiger Forschung [15], [56], [57]. Das Verständnis dieser Wechselwirkungen bildet u.a. die Grundlage für unsere heutige (medizinische) Bildgebung, für eine fundierte Risikoabschätzung sowie für die Entwicklung neuer Therapieansätze in der Behandlung von Krankheiten [19], [54], [55].

Die Erkenntnis, dass Ultraschall einen biophysikalischen Effekt hat, geht maßgeblich auf den französischen Forscher Paul Langevin zurück [55]. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts, etwa 30 Jahre nach der Entdeckung des piezoelektrischen Effekts durch die Brüder Paul-Jacques und Pierre Curie, entwickelte Paul Langevin eine der ersten Anwendungen von Ultraschall zur Schallfeldmessung unter Wasser zur Ortung von U-Booten. Hierbei entdeckte er unter anderem auch den zerstörerischen Effekt, den Ultraschall auf Materie haben kann [55]. Diesen biophysikalischen Effekt des *high intensity focused ultrasound* (HIFU) hat man sich lange Zeit für die Behandlung von Krankheiten wie den (medikamentenrefraktären) Temporallappenepilepsien, Tremorerkrankungen sowie dem neuropathischen Schmerz zu Nutze gemacht [50], [58]. Mit der Zeit verschob sich dieser Forschungsschwerpunkt jedoch und die Auswirkungen

des *low intensity focused ultrasound* (LIFU) als reversible Möglichkeit der Neuromodulation, rückten immer mehr in den Fokus der Wissenschaft [58]–[60]. Der der Wirkung zu Grunde liegende Mechanismus des Ultraschalls ist bis heute nicht vollständig verstanden [50] und so werden thermische (vor allem bei HIFU) als auch nicht-thermische Ursachen (besonders bei LIFU) für die biophysikalische Wirkung des Ultraschalls diskutiert [17], [50], [58]. Erstere lassen sich durch die Ausbreitung des Schalls im Gewebe erklären. Im Allgemeinen folgt diese den Gesetzen der Optik. Durch eine Änderung der Dichte und der Ausbreitungsgeschwindigkeit an den Grenzflächen des Gewebes kommt es zur Reflexion der Schallwelle. Diese trifft rückläufig mit der neu eintretenden Schallwelle zusammen. Lokal führt dies zu einer Intensitätserhöhung und starken Überwärmung des Gewebes mit z.T. destruktivem Ausmaß [54]. Die Wärmeproduktion ist hierbei nicht nur abhängig von der zugeführten Energie, sondern auch von der Zeit t der Ultraschallexposition. So lange kein Gleichgewicht aus Wärmeabgabe und Wärmeproduktion besteht und letztere überwiegt, heizt sich der beschallte Körper auf. Hierbei gilt, dass eine Zunahme der Temperatur um 10°C zu einer Verdopplung der enzymatischen Reaktion im Gewebe führt (Q10-Regel) [55]. Dies gilt bis zu einer Temperatur von etwa $39^{\circ}\text{C} - 43^{\circ}\text{C}$. Darüber kommt es zu einer Proteindenaturierung und in Folge dessen zu einem Funktionsverlust der bestehenden biologischen Mechanismen [17], [55]. Neben den thermischen Effekten werden jedoch auch die nicht-thermischen Wirkungen des Ultraschalls als Ursache seiner biophysikalischen Eigenschaften diskutiert. Hierbei steht u.a. die Kavitation im Mittelpunkt derzeitiger Forschung [50], [54], [55]. Während der Unterdruckphasen der Schallwellen kann es in Flüssigkeiten zur Ausbildung kleiner, kurzlebiger Gaseinschlüsse kommen, die ein eigenes Resonanzverhalten aufweisen und sich zu größeren Bläschen weiterentwickeln [55]. In Abhängigkeit von der Art der Blasen können hierbei zwei unterschiedliche Typen der Kavitation unterschieden werden:

- **Typ 1** beruht auf dem Einschluss von Dampf und wird als transiente bzw. harte Kavitation bezeichnet. Durch das stetige Größenwachstum der Dampfbläschen während der Unterdruckphasen können diese implodieren und dabei lokal sehr hohe Temperaturen von bis zu $4727^{\circ}\text{C} - 9727^{\circ}\text{C}$ freisetzen. Zudem entsteht ein Implosionsdruck, der zusätzlich zu den freigesetzten Radikalen ein sehr hohes Schädigungspotential aufweist.
- **Typ II** wird auch als stabile bzw. weiche Kavitation bezeichnet. Hier kommt es nicht zu energiereichen Implosionen, da die durch das Schallfeld in Oszillation versetzten Gaseinschlüsse durch das Gas selbst gedämpft werden [54].

Neben der Kavitation wird auch die Aktivierung mechanosensitiver Ionenkanäle als mögliche

nicht-thermische Ursache der durch Ultraschall-Applikation induzierten Wirkung diskutiert [61]. Grundlage der im Folgenden in Abbildung 5 dargestellten Modellvorstellung ist die Annahme, dass durch den immer wiederkehrenden Wechsel aus Über- und Unterdruck die Lipiddoppelschicht rhythmisch auseinander- und zusammengeschoben wird. In Abhängigkeit von der Stärke der einwirkenden Kraft kommt es hierbei lokal sowohl zu transienten Veränderungen wie der Aktivierung von Ionenkanälen als auch zu bleibenden Schäden wie der Ruptur der Zellmembran [62].

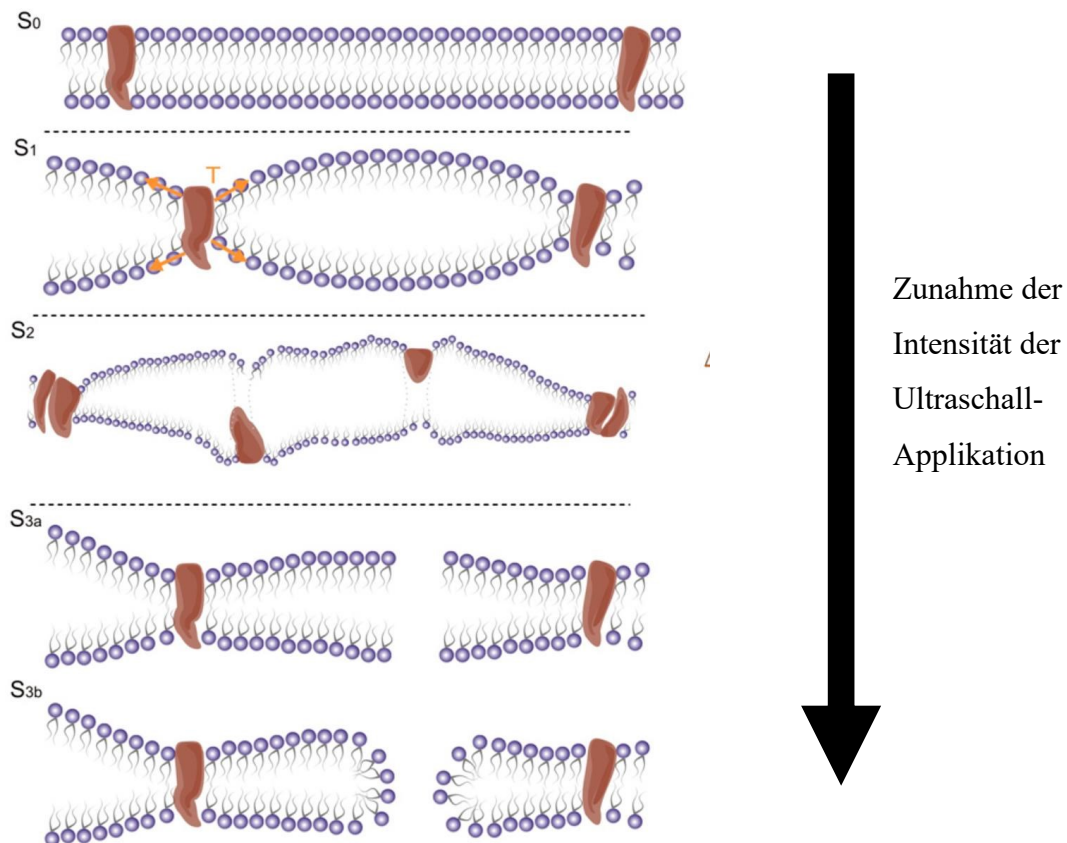


Abbildung 5: Intramembrane Kavitation. Die Abbildung zeigt die unterschiedlichen Auswirkungen von Ultraschall auf die Lipiddoppelschicht einer Zellmembran sowie des Zytoskeletts. Zu Beginn liegt keine Krafteinwirkung auf die Membran vor. Dies ist der sog. Ausgangszustand (S₀). Bei zunehmender Spannung werden zunächst mechanosensitive Rezeptoren aktiviert (S₁). Steigt die Spannung weiter, führt dies zu Membranschädigungen (S₂) und schließlich zu bleibenden Poren innerhalb der Lipiddoppelschicht (S_{3a} und S_{3b}). (Abbildung aus [62] Fig. 4).

Inwieweit Ultraschall-Applikation im Bereich des *low intensity focused Ultrasound* Einfluss auf die Spontanaktivität bestimmter Zellgruppen im Hippocampus nehmen kann, ist weiterhin nicht vollständig geklärt. Neben den zuvor genannten Theorien verstärkt sich auch immer mehr die Annahme, dass oszillatorische Mechanismen wesentlichen Anteil an dieser Einflussnahme haben [63]. Das optimale Frequenzspektrum sowie die Dauer der Applikation der Ultraschallbehandlung zur Therapie der (medikamentenrefraktären) Temporallappenepilepsien ist hierbei ein wesentlicher Gegenstand heutiger Forschung. Mehrere Studien verdeutlichen, dass der wirksame Bereich des Ultraschalls zur Erzielung einer Neuromodulation sehr eng ist und die Wirkung des Ultraschalls im Sinne einer Erregung oder Hemmung von mehreren Parametern abhängt, die sich gegenseitig beeinflussen [19], [64]. Dies sind u.a. die Frequenz sowie die Dauer der Ultraschall-Applikation [64]. Eine mehrere Sekunden bis Minuten anhaltende Ultraschall-Behandlung soll nach heutigem Kenntnisstand zu einer Reduktion der zellulären Aktivität im Bereich der pyramidalen CA1-Region im Säugetiergehirn führen [64]. Frequenzen zwischen 400 – 800 kHz scheinen für die transkranielle Applikation des Ultraschalls optimal geeignet [16]. In der hier vorliegenden Arbeit wurde der Ultraschall mit einer Frequenz von 800 kHz direkt auf das Hirngewebe appliziert. Hierdurch blieb der zusätzlich dämpfende Effekt des Knochendeckels aus und die Schallwellen konnten zum Großteil direkt auf das eigentliche Gewebe wirken. Inwieweit sich dies positiv oder negativ auf den erwünschten Effekt auswirkt, ist unklar.

2.2 Oszillationen

Cortex, Hippocampus und Striatum sind wesentlich an unserer Gedächtnisbildung beteiligt [65]. Auf der Basis oszillatorischer Mechanismen ist unser Gehirn dazu befähigt, neu wahrgenommene Ereignisse zu verschlüsseln, zu speichern und bei Bedarf wieder abzurufen [30], [63], [65]. Die Grundlage dieser Gedächtniskonsolidierung bilden Oszillationen u.a. im Delta-, Theta- und Gamma-Frequenzbereich [31], [65]. Besonders letztere sind mit sog. *bottom-up* Prozessen assoziiert, während die langsameren Frequenzen u.a. im Theta- und Delta-Bereich sog. *top-down* Prozesse generieren [31]. Diese zeigen sich für die Integration der durch *bottom-up* Prozesse verbreiteten Information als wesentlich [30], [31], [40]. Auch während des Schlafes zeigt sich im Gehirn eine durchgehende elektrische Grundaktivität. Diese ist maßgeblich an der Gedächtnisbildung beteiligt [27], [66]. Schlaf kann, wie in der folgenden Tabelle 1 dargestellt, im Wesentlichen in die beiden übergeordneten Gruppen des nREM (bestehend aus den Stadien 1-4, wobei Stadium 3 und 4 dem Tiefschlaf zugeordnet

werden und auch langsamwelliger Schlaf genannt werden) und des REM Schlafes eingeteilt werden.

Tabelle 1: Schlafstadien nach Rechtschaffen und REM-Schlaf

Stadium		Kennzeichen
nREM	Schlafstadium 1	Zerfall des Grundrhythmus und Auftreten von okzipitalen θ -Wellen; langsame horizontale Augenbewegungen
	Schlafstadium 2	Auftreten von Schlafspindel und/oder K-Komplexen
	Schlafstadium 3	Auftreten hochamplitudiger, irregulärer δ -Wellen in 20-50%
	Schlafstadium 4	δ -Wellen > 50%
REM-Schlaf		Vergleichbar mit einem Wach-EEG findet sich ein α -Grundrhythmus, aber bei völliger Muskelrelaxation (keine Muskelartefakte!); charakteristische rasche und ruckartige horizontale Augenbewegungen, die als Artefakte ein „Sägezahnbild“ erzeugen

(Tabelle nach [9] S. 97 Tab. 3.8)

Der Übergang von einer Schlafphase in eine andere ist in der Regel fließend und äußert sich unter anderem durch Veränderungen der oszillatorischen Mechanismen. Diese basieren vorwiegend auf dem periodischen Wechsel aus Exzitation und Inhibition, der sich in neocorticalen Pyramidenzellen durch den synchronisierten Wechsel aus Phasen vermehrter exzitatorischer Aktivität, die zu einer Steigerung der Membranleitfähigkeit führen (*upstate*) und Phasen verminderter Aktivität, die zu einer Abnahme führen (*downstate*), äußert [40], [65], [67]–[69]. Laufende EEG-Ableitungen verdeutlichen, dass hierbei eine enge Korrelation zu dem Auftreten hippocampaler hochamplitudiger scharfer Wellen besteht [70]: Während Phasen des neocorticalen *downstates* scheint das Auftreten hippocampaler hochamplitudiger scharfer Wellen wahrscheinlicher. Umgekehrt scheinen hochamplitudige scharfe Wellen den Übergang der neocorticalen Zellen vom *down-* zum *upstate* zu vereinfachen bzw. zu bedingen [70]. Besonders während des langsamwelligen Schlafes konnte nachgewiesen werden, dass eine verminderte Aktivität nicht mit erhöhter interneuronaler Erregung assoziiert sein muss: Dem jeweiligen *downstate* kann auch ein bloßes Ausbleiben der neuronalen Exzitation zu Grunde liegen.

Dieses Phänomen wird auch als Disfacilitation bezeichnet und führt zu einer übermäßigen Hyperpolarisation neuronaler Zellen [71].

Während des langsamwelligen Schlafes dominieren Oszillationen im *slow mode*. Diese basieren vorwiegend auf Delta-Oszillationen im kortikalen und striatalen Kreislauf sowie irregulärer Aktivität im Hippocampus[65]. Letztere beruht auf einer Erregung der Pyramidenzellen und Interneuronen der CA1-Region durch Afferenzen aus CA3 und treten besonders zu Beginn der sog. *upstates* auf [65]. Sie scheinen an der Generierung epileptischer Ereignisse im Rahmen der Temporallappenepilepsien beteiligt zu sein. Durch die direkte Verbindung des entorhinalen Cortex mit dem Hippocampus beeinflussen Delta-Oszillationen, die ursprünglich im Cortex generiert worden sind, unmittelbar das Membranpotential der verschiedenen hippocampalen Zellen. Diese Veränderungen sind oft schwächer ausgeprägt als im Cortex selbst und zeigen nicht die typischen Phasen des *up-* und *downstates*, können jedoch über oszillatorische Mechanismen Einfluss auf die neuronalen Zellen des hippocampalen Formenkreises nehmen [65].

Im Gegensatz zu den Theta- und Gamma-Oszillationen sind Delta-Oszillationen keiner spezifischen Zellgruppe zuzuordnen. Neurowissenschaftliche Studien zeigen jedoch, dass GABA_A-Rezeptoren die Synchronisierung der Delta-Frequenz zu fördern und das Auftreten von Spindeln im EEG zu reduzieren scheinen. Daher wird angenommen, dass ein Defizit an GABA_A-Mechanismen das Auftreten epileptischer Aktivität während des bioelektrischen Status epilepticus im Schlaf sowohl in der Kindheit als auch im Erwachsenenalter vereinfacht. Auf dieser Annahme beruht auch der bis heute bevorzugte Einsatz von Benzodiazepinen zur Therapie des epileptischen Anfalls. Diese entwickeln ihre Wirkung hauptsächlich an GABA_A-Rezeptoren. Des Weiteren verdeutlichen EEG-Auswertungen, dass während des nREM eine erhöhte Neigung zu epileptiformer Aktivität besteht, während diese während des REM deutlich abnimmt: Zu Beginn des nREM zeigen sich bevorzugt Spindeln, welche mit zunehmender Schlaftiefe durch langsame Oszillationen im Delta-Frequenzbereich ersetzt werden. Diese Veränderung geht mit einer Stabilisierung der oszillatorischen Mechanismen sowie einer Reduktion der Acetylcholin-Konzentration einher. Dadurch wird auch eine Abnahme iktaler Spontanentladungen erreicht [72], [73]. Eine mögliche Erklärung dieser Verlaufsveränderungen im EEG wurde u.a. von L. Nobili geliefert [73]. Er stellt dar, dass zu Beginn des nREM ein verminderter Einfluss aus der *formatio reticularis* des Hirnstammes zu verzeichnen ist. Dies ermöglicht das Auftreten von Spindeln, die besonders im Kindesalter mit einer erhöhten Neigung zu epileptischen Entladungen während des bioelektrischen Status epilepticus im Schlaf einhergehen. Mit zunehmender Schlaftiefe kommt es zu einer Hyperpolarisation der

thalamocorticalen Zellen. Dies führt zu synchronisierten langsamen Entladungen im Delta-Frequenzbereich und geht mit einer verminderten Neigung zu epileptiformer Aktivität einher. Während der Zeit der Delta-Oszillationen im *slow mode* finden sich lediglich sehr niedrige Acetylcholin-Spiegel im Hippocampus [74]. Dies ändert sich im sog. *fast mode*, der besonders im Wachzustand sowie während des REM vorherrschend ist und sich durch Theta-Oszillationen im Bereich des Hippocampus auszeichnet [74]. Gamma-Rhythmen finden sich zu dieser Zeit im gesamten Gehirn wieder [65]. Eine Änderung der Acetylcholin-Konzentration ist an einem Übergang der verschiedenen oszillatorischen Grundrhythmen ineinander beteiligt. Durch einen Anstieg dieses Neurotransmitters kann ein Wechsel zwischen *slow mode* und *fast mode* induziert werden: Die Wirkung des Acetylcholins an muscarinischen Rezeptoren synchronisiert die oszillatorischen Mechanismen in CA1-Pyramidenzellen und induziert Oszillationen im Gamma-Frequenzbereich [75]. Auch $\alpha 7$ -positive nicotinische Acetylcholin-Rezeptoren scheinen an der modulierenden Wirkung dieses Neurotransmitters beteiligt zu sein. Ihr Wirkungsspektrum basiert besonders auf der Reduktion der synaptischen Transmission via Schaffer-Kollaterale zwischen der hippocampalen CA3- und CA1-Region [76].

Der Begriff der „Gamma-Oszillationen“ wurde erstmals 1938 durch Jasper und Andrews verwendet, die so eine Abgrenzung der durch Berger 1929 titulierten Definition aus Alpha- und Beta-Rhythmen bilden wollten [77]. Die beiden letztgenannten griechischen Buchstaben dienten bis zu diesem Zeitpunkt der Differenzierung von Frequenzmustern < 12 Hz mit hohen Amplituden und den entsprechend schnelleren Mustern mit niedrigerer Amplitude. Später, in den 1980er Jahren, entstand schließlich, besonders durch Veröffentlichungen von Walter Freeman, der Begriff der Gamma-Oszillationen. Hiermit wurden periodische Oszillationen beschrieben, die in einem Frequenzbereich zwischen 30 – 90 Hz liegen. Darüber sprach man von sog. Epsilon-Oszillationen [77]. Diese Einteilung der verschiedenen Oszillationen hat bis heute Bestand. Mittlerweile unterteilt man den Bereich der Gamma-Oszillationen jedoch noch in weitere Untergruppen, die besonders durch ihre unterschiedliche Verteilung in den verschiedenen Gehirnregionen auffallen: So können sog. langsame Gamma-Oszillationen (~ 40 Hz), mittlere Gamma-Oszillationen (~ 80 Hz) und schnelle Gamma-Oszillationen (~ 120 Hz) unterschieden werden [74], [78]. Die Gemeinsamkeit der entsprechenden Regionen, bestehend aus entorhinalem Cortex, Amygdala, Hippocampus, Striatum, Bulbus olfactorius und Thalamus ist das Vorkommen inhibitorischer Interneuronen, die über GABA_A-Rezeptoren interagieren. Diese scheinen daher eine wesentliche Rolle an der Generierung von Gamma-Oszillationen zu besitzen [77]. Das universelle Auftreten der Gamma-Oszillationen sowie die starke Korrelation mit verschiedenen Prozessen im Gehirn bildet die Grundlage für

ihre wissenschaftliche Bedeutung. Durch eine genauere Untersuchung ihres Entstehungsmechanismus erhofft man sich, Aufschluss über die neuronalen Zusammenhänge von Gesundheit und Krankheit zu erlangen [77], [79]. Es ist bekannt, dass die Fähigkeit verschiedener Neuronen, ihre Aktionspotentiale innerhalb von Millisekunden exakt zu generieren, wesentlich auf schnellen Änderungen ihres Membranpotentials beruht. Diese Hochfrequenzmuster werden hauptsächlich durch endogene Oszillationen herbeigeführt [22], [77], [80]. Die Gamma-Oszillation ist hierbei am stärksten vertreten [77].

Durch einen Anstieg der Acetylcholin-Konzentration im Bereich der CA3-Region des Hippocampus, können über AMPA- und Kainat- sowie metabotrope Glutamat-Rezeptoren Gamma-Oszillationen im langsamen Gamma-Bereich induziert werden. In der CA1-Region sind vorrangig Oszillationen im Frequenzbereich von ~80 Hz vorherrschend. Da auch in diesem Fall die verschiedenen Bereiche in enger anatomischer und histologischer Lage zueinander stehen, zeigt sich eine gegenseitige Beeinflussung und Kopplung, die sich vor allem in der Phasenkopplung der Theta-Gamma-Oszillationen widerspiegelt [81]: Gamma-Oszillationen treten hauptsächlich während Phasen abklingender Theta-Oszillationen in Pyramidenzellen auf und regulieren so über GABAerge synaptische Übertragung maßgeblich das pyramidale Entladungsverhalten [82]. An dieser pyramidal-interneuronalen synaptischen Verbindung sind vor allem parvalbuminpositive Korbzellen beteiligt, die durch ihre Lage an den Somata der Pyramidenzellen unmittelbar Einfluss nehmen können [82]. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine von extern applizierte Gamma-Frequenz unterschiedlicher Geschwindigkeit in den jeweiligen Zellen diesen Grundrhythmus induzieren kann. Hierbei ist es unabhängig, ob es sich um langsame, mittlere oder schnelle Gamma-Oszillationen handelt [74].

Bis heute konnte kein eindeutiges „Schrittmacherzentrum“ für die Generierung von Gamma-Oszillationen gefunden werden. Vielmehr geht man davon aus, dass sich verschiedene Gehirnregionen mit ihren unterschiedlichen Frequenzen gegenseitig beeinflussen und miteinander verknüpft sind [78]. Die beiden bis heute dominierenden Modellvorstellungen zur Generierung von Gamma-Oszillationen basieren im Wesentlichen auf vier Grundannahmen und sind im Folgenden dargestellt:

- 1) Gamma-Oszillationen sind unzertrennlich mit perisomatischer Inhibition verbunden.
- 2) Gamma-Oszillationen sind kurzlebig und basieren auf einem periodischen Wechsel aus Exzitation und Inhibition.
- 3) Gamma-Oszillationen treten typischerweise mit irregulärer Entladung einzelner Neuronen auf; ihre Frequenz variiert stark und ist abhängig vom zu Grunde liegenden Mechanismus.

- 4) Gamma-Oszillationen werden durch langsamere Rhythmen beeinflusst (Thesen aus [77]).

Die biophysikalischen Grundvoraussetzungen dieser Annahmen sind eng mit den Eigenschaften und Funktionsweisen mehrerer involvierter Rezeptoren und Neuronen verknüpft. Hierzu gehören im Wesentlichen Parameter wie die Zeitkonstante von GABAA- und (AMPA)-Rezeptoren, die Membranzeitkonstante der jeweiligen kortikalen Pyramidenzellen sowie das kritische Zeitfenster der von der Entladungszeit abhängigen Plastizität. Die hier dargestellten Voraussetzungen bilden die Grundlage für die Fähigkeit, Einflüsse aus verschiedenen stromaufwärts gelegenen Quellen untereinander auszutauschen und in die verschiedenen neuronalen Vorgänge zu integrieren [77], [83]. Die dargestellte gegenseitige Beeinflussung und untereinander bestehende Verknüpfung hat zu der Hypothese geführt, dass diese funktionellen Zellzusammenschlüsse vor allem dem Weitertransport von Information dienen. Man geht davon aus, dass durch kollektive Entladungen nachfolgende postsynaptische Neuronen erregt werden können [22]. Stromabwärts gelegene Zellen fungieren in diesem Zusammenhang als „Empfänger“ der neuronalen verschlüsselten Information und tragen diese im Rahmen des „kritischen Zeitfensters“ durch kollektive Entladungen weiter. Das Entladungsverhalten der stromaufwärts gelegenen neuronalen Zusammenschlüsse liegt außerhalb dieses kritischen Zeitfensters und ist Bestandteil einer anderen temporären Zellgemeinschaft [77].

Basierend auf diesen neuroanatomisch-physiologischen Grundlagen lässt sich schlussfolgern, dass der Entstehungsmechanismus der Gamma-Oszillationen auf einem funktionellen Zusammenschluss mehrerer Neuronen beruhen muss. Die **erste Modellvorstellung** beschreibt in diesem Zusammenhang eine reine Interaktion zwischen den verschiedenen Interneuronen. Diese werden durch einen exogenen exzitatorischen Reiz erregt und treten reziprok über synaptische Verschaltungen miteinander in Verbindung. Dies führt über mehrere Zyklen zu einer synchronisierten gegenseitigen Exzitation und Inhibition der jeweiligen Interneuronen [65], [77]. Dieser Mechanismus des interneuronalen Gamma-Netzwerkes ist ausschließlich in *in vitro* Experimenten möglich und wird daher nicht als ausschlaggebend für die Generierung von Gamma-Oszillationen *in vivo* angesehen [65]. Auf der Grundlage der hier durchgeführten *in vitro* Experimente bilden sie jedoch einen nicht unerheblichen Anteil der möglichen Interaktionen.

Die **zweite Modellvorstellung** basiert auf der anatomisch-histologischen Lage der Interneuronen im Hippocampus. Diese liegen im intakten Gehirn zwischen zahlreichen Pyramidenzellen und stehen mit diesen in synaptischer Verbindung. Exzitatorische Entladungen der Pyramidenzellen aktivieren über zahlreiche Synapsen die jeweiligen Interneuronen, die über einen

Feedback-Mechanismus eine temporäre rückläufige Inhibition dieser Verschaltung generieren [65], [77]. Dieser Mechanismus des pyramidal-interneuronalen Gamma-Netzwerkes stellt die physiologische Grundlage der Generierung von Gamma-Oszillationen *in vivo* dar und tritt besonders in Phasen abklingender Theta-Oszillationen in den pyramidalen Zellen auf.

Ein Ungleichgewicht an Gamma-Oszillationen, wie auch der Theta-Eigenfrequenz der Pyramidenzellen, gilt als wesentliches Merkmal der Epileptogenität. Zudem besteht ein enger Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von steilen Wellen und Feldoszillationen sowie der Generierung ichtaler Ereignisse im Hippocampus [84]. Hierbei scheint die hippocampale CA3-Region maßgeblichen Einfluss auf die Generierung von langsamen Wellen sowie Feldoszillationen zu besitzen [68]. Eine Beteiligung von Interneuronen, sowie Oriens-lacunosum-moleculare Zellen, ist in diesem Zusammenhang ebenfalls sehr wahrscheinlich [74].

Dieses Ungleichgewicht stört den fließenden Übergang von einem in den anderen Oszillationsrhythmus [72], [76]. Im gesunden Säugetiergehirn besteht eine Balance zwischen den verschiedenen oszillatorischen Mechanismen [67], [85], wobei es über GABAerge synaptische Übertragung hierbei zu einer Limitation der pyramidalen *upstates* kommt [67].

Präsynaptische GABA_A1a-Rezeptoren dienen der spontanen Beendigung der pyramidalen Erregung, während postsynaptische GABA_A1b-Rezeptoren über afferente Einströme eine entsprechende Terminierung induzieren [86].

Der den beschriebenen oszillatorischen Mechanismen zu Grunde liegende histologisch-anatomische Zusammenhang wurde bereits zu Beginn der Arbeit in Abbildung 3 dargestellt.

Der eigentliche Ursprung bzw. ein sog. Schrittmacherzentrum konnte bisher für keinen oszillatorischen Grundrhythmus genau definiert werden. Die präferierte Eigenfrequenz der Pyramidenzellen im Thetabereich wird momentan auf die Kommunikation verschiedener oszillatorischer Zentren zurückgeführt, die u.a. über HCN-Kanäle eine hohe Synchronisierung der jeweiligen Theta-Oszillationen ermöglichen. Für den Gamma- und Delta-Frequenzbereich bestehen bis zum heutigen Zeitpunkt ebenfalls nur Hypothesen bezüglich ihres Entstehungsmechanismus. Wesentlich ist jedoch, dass eine gegenseitige Beeinflussung nicht auf einen oszillatorischen Mechanismus beschränkt ist, sondern dass auch in den unterschiedlichen Oszillationsbereichen eine gegenseitige Kopplung und Beeinflussung stattfindet. So sind besonders die Theta- und Gamma-Oszillationen phasen- und amplitudengekoppelt [31], [74], [87].

3 Zielstellung der Arbeit

Wie in neurowissenschaftlichen Studien nachgewiesen werden konnte, basiert die Gedächtnisbildung im Wesentlichen auf dem synchronisierten und desynchronisierten Wechsel verschiedener oszillatorischer Mechanismen im Gehirn, die im wechselseitigen Zusammenspiel auch für die epileptischen Entladungen pathogenetisch wirksam sind. Ein Ungleichgewicht dieser physiologischen Abläufe ist assoziiert mit bzw. führt zur Entstehung zahlreicher Erkrankungen, wie beispielsweise den (medikamentenrefraktären) Temporallappenepilepsien. Da chirurgische Therapieansätze wie die Temporallappenteilresektion invasive Maßnahmen mit den entsprechenden Risiken darstellen, wird nach neuen, nicht-invasiven Möglichkeiten in der Behandlung dieser Erkrankungen gesucht. Hierbei wird unter anderem die Ultraschall-Applikation, auf Grund ihrer zuvor dargestellten biophysikalischen Eigenschaften, derzeit wissenschaftlich untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass besonders langsame Rhythmen eine Synchronisierung der oszillatorischen Mechanismen bewirken und dadurch zu einer Reduktion iktaler Ereignisse führen. Schnelle Entladungen sind hingegen mit einer Desynchronisation assoziiert und in diesem Zusammenhang mit gehäuftem Auftreten epileptischer Ereignisse vergesellschaftet [37].

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Auswirkung von *low intensity focused ultrasound* (LIFU) auf die Spontanaktivität hippocampaler Pyramidenzellen der CA1-Region in wissenschaftlichen *in vitro* Experimenten an Ratten-Hippocampus-Schnitten untersucht und in den derzeit vorliegenden wissenschaftlichen Kontext gesetzt werden. Ziel ist es, Aufschluss über die möglichen zu Grunde liegenden biophysikalischen Mechanismen der Ultraschall-Applikation zu erlangen und neue, nicht-invasive Therapiemöglichkeiten u.a. im Bereich der (medikamentenrefraktären) Temporallappenepilepsien zu entwickeln.

4 Material und Methoden

Für die vorliegende Arbeit wurden hippocampale Schnitte von Rattenhirnen angefertigt, um die Auswirkungen von *low intensity focused ultrasound* (LIFU) untersuchen zu können. In diesem Kapitel werden die nötigen Schritte zur Herstellung und Vorbereitung der Schnitte erläutert, der Messplatz erklärt und die durchgeführten Messungen diskutiert.

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien

Die nachfolgend in Tabelle 2 aufgeführten Chemikalien wurden u.a. für die Herstellung der verschiedenen Lösungen benötigt. Eine genauere Darstellung ihres Verwendungszwecks findet sich in Abschnitt 4.1.5.

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien

Substanz	Vollständiger Name
$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Calciumchlorid (Dihydrat)
95% O_2 ; 5% CO_2	Carbogen-Gas
$\text{H}_5\text{C}_2\text{-O-C}_2\text{H}_5$	Diethylether
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	D-(+)-Glucose
Feuerzeuggas	
HCl	Salzsäure (1 M, 5 M); rauchend
$\text{C}_2\text{H}_3\text{KO}_2$	Kaliumacetat
KCl	Kaliumchlorid
MgCl_2	Magnesiumchlorid
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO_3	Natriumhydrogencarbonat
NaH_2PO_4	Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natronlauge (1 M)
$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	Sucrose/Saccharose

4.1.2 Ein- und Mehrwegmaterial

Das in Tabelle 3 dargestellte Ein- und Mehrwegmaterial bildete die Grundlage der durchgeführten Messungen. Eine genaue Darstellung des Messablaufs folgt in der anschließend beschriebenen Methodik (Abschnitt 4.2) und stellt einen separaten Abschnitt dieser Arbeit dar.

Tabelle 3: Auflistung des verwendeten Ein- und Mehrwegmaterials

Produkt	Typenbezeichnung/Lieferant
Begasungsfritte	
Borosilikatröhrchen, GB 150F-8P	Science Products, Hofheim, Deutschland
Borosilikatröhrchen, GB 120F-10	Science Products, Hofheim, Deutschland
Doppelspatel	Bochem Instrumente, Weilburg, Deutschland
Einmal-Feindosierspritze, Omnifix®-F 1ml	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Einmal-Spritze, 50ml	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Federschere nach <i>Vannas</i> , fein, 8cm	Geuder, Heidelberg, Deutschland
Gasverteilungsrohr	Typ B (Robu, Hattert, Deutschland)
Glasflaschen, 1000ml	Schott, Mainz, Deutschland
Glasflaschen, 2000ml	Schott, Mainz, Deutschland
Linsenreinigungspapier	Kodak, New York, USA
Messkolben, 500ml	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Messkolben, 1000ml	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Messkolben, 2000ml	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Platindraht, 0,05mm	WPI, Saratota, USA
Präzisionspipette, No. 5	Dumont & Files, Montignez, Schweiz
Rundbodengläser	Schott, Mainz, Deutschland
Rundfilter	70 mm (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Sekundenkleber	UHU, Bühl, Deutschland
Silberdraht, 0,005 Zoll	Science Products, Hofheim, Deutschland
Stahlklingen	Campden Instruments, Campden England
Silikonschläuche	VWR international, West Chester, USA
Skalpell	Präzisa plus (P. J. Dahlhausen, Köln, Deutschland)
Spatellöffel	Bochem Instrumente, Weilburg, Deutschland

4.1.3 Geräte

Die in Tabelle 4 aufgelisteten Geräte wurden sowohl für die Anfertigung der Ratten-Hippocampus-Schnitte als auch für die Durchführung der extrazellulären und intrazellulären Messungen benötigt.

Tabelle 4: Für die Messung verwendete Geräte

Gerät	Typenbezeichnung/Lieferant
Absaugvorrichtung	ALA VWK, ALA Scientific Instruments, Westbury, USA
Analog-Digital-Konverter	Power 1401, CED, Cambridge, England
Aufbewahrungskammer	IPHYS, Rostock, Deutschland
Bad	Haake 5P, Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Badthermostate	Haake C10, Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Betriebssystem	Windows 2000, Microsoft, Redmond, USA
Extrazellulärverstärker	IPHYS, Rostock, Deutschland
Faradaykäfig	IPHYS, Rostock, Deutschland
Frequenzgenerator	Master 8, A.M.P.I., Jerusalem, Israel
Guillotine	small animal decapitator, Stoelting, Wood Dale, USA
Interfacekammer	BSC-HAT, Harvard Apparatus, Holliston, USA
Intrazellulärverstärker	SEC/GIA 05X, npi electronic, Tamm, Deutschland
Kaltlichtquelle	KL 1500 LCD, Schott, Mainz, Deutschland
Kühl- und Gefrierschrank	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Magnetrührer	RH basic 2, IKA, Staufen, Deutschland
Mikromanipulator	LBM7, Scientifica, Harpenden, England
Mikromanipulatormotor	IW-800 EXFO, Ontario, Kanada
Mikromanipulatormotorkontroller	8200 EXFO, Ontario, Kanada
Mikropipettennadel	MicroFil MF28G WPI, Saratota, USA
Mikroskop	Eclipse E600, Nikon, Tokio, Japan
Narkosekammer, Eigenbau	IPHYS, Rostock, Deutschland
Osmometer	Knauer Osmometer automatic, Knauer GmbH, Berlin,
Oszilloskop	TDS 1001, Tectronix, Beaverton, USA
pH-Meter	CG840, Schott, Mainz, Deutschland
Pipette, 10µl bis 100µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipette, 100µl bis 1000µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenziehgerät	PIP 5, HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland

Pipettenziehgerät	P-97, Sutter Instrument, Novato, USA
Pulsstimulator	A365, WPI, Sarasota, USA
Rollerpumpe	Minipuls®3, Gilson, Villiers le Bel, Frankreich
Software	Signal 2.16, CED, Cambridge, England
Stereomikroskop	Wild Heerbrugg, Gais, Schweiz
Temperaturregler	TC-10, npi electronic, Tamm, Deutschland
Tisch, schwingungsgedämpft	TMC, Peabody, USA
Vibratom	Intergraslice 7550 MM, Campden Instruments, Campden, UK
Vibratom,	Ci 7000 smz , Campden Instruments, Campden, England
Waage	MC1 analytic AC 1205, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
RF-Generator	AG 1016, T&C Power Conversion, Inc., Rochester, USA
Ultraschallwandler	vom Fraunhofer-Institut St. Ingbert entwickelt

4.1.4 Versuchstiere

Für alle Versuche wurden männliche Wistar-Ratten (Charles River Deutschland, Sulzfeld) verwendet. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Experimente zwischen 1,5 und 5 Monate alt. Ihre Haltung erfolgte zu maximal 1 - 3 Tieren pro Käfig, bei 12 h Beleuchtung/Tag, 27 °C und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit. Wasser und Futter standen *ad libitum* zur Verfügung.

4.1.5 Lösungen

Zur Herstellung aller Lösungen wurde mehrfach destilliertes Wasser verwendet, dem die in Tabelle 2 genannten Substanzen in gleicher Quantität und Qualität zugeführt wurden. Ein zuvor gereinigter Magnetrührer diente der Vermischung und die gleichzeitig erfolgende Carbogen-Begasung der Herstellung eines Puffersystems.

Der pH-Wert aller unten genannten Lösungen wurde auf 7,4 eingestellt. Dies geschah mittels Zuführens der entsprechenden Mengen von NaOH (1 M) bzw. HCl (1 M, 5 M). Durch regelmäßige Kalibrierung des Gerätes wurde eine fehlerhafte pH-Angabe auf ein Minimum reduziert. Durch die händische Zugabe von Säure- bzw. Basenlösung sind jedoch kleinere Abweichungen nicht vollständig auszuschließen.

Im Anschluss an die pH-Wert Bestimmung wurde die Osmolalität der Lösungen mit Hilfe eines Osmometers analysiert. Diese unterschied sich je nach Stammlösung und lag bei der zur Präparation verwendeten Saccharoselösung im Bereich von 310 - 330 mosmol/kg H₂O. Der Osmolalitätsbereich der zur Aufbewahrung der histologischen Schnitte sowie der zur

intra- und extrazellulären Ableitung verwendeten künstlichen Liquorlösung lag zwischen 304-320 mosmol/kg. Dieser enge Osmolalitätsbereich war wichtig für die Durchführung der anschließenden Messungen, da die Glucosekonzentration in der künstlichen Liquorlösung und der Saccharoselösung invers mit den evozierten exzitatorisch postsynaptischen Potentialen (EPSP) korreliert ist [88]: Die frühe EPSP Amplitude sinkt um 10 – 68 %, sobald die Glucoseosmolalität um 20 – 80 mOsm steigt. Wenn im Gegenzug die Osmolalität um 30 – 50 mOsm sinkt, steigt die EPSP Amplitude um 20 – 40 % [88]. Der Eingangswiderstand, das Schwellenpotential sowie das Membranpotential scheinen jedoch durch die Glucoseosmolalität unbeeinflusst. Des Weiteren steigert Hypoosmolalität nachgewiesenermaßen die Entladungsfrequenz in Mg^{2+} freier künstlicher Liquorlösung. Ein entsprechend gegensätzlicher Effekt ist bei Hyperosmolalität zu beobachten. Die synaptische Transmission via *Schaffer-Kollaterale* im Bereich der hippocampalen synaptischen Verbindung zwischen CA3-CA1 soll durch die Glucosekonzentration allerdings unbeeinflusst bleiben [88]. Entsprechend der oben aufgeführten Einflussnahme der Glucosekonzentration auf die zelluläre Erregbarkeit sind Schwankungen in den Messdaten nicht vollständig auszuschließen. Diese mögliche Fehlerquelle verteilt sich allerdings auf eine relativ große Anzahl von Messungen und die Variationen der jeweiligen Osmolalitäten liegen bei maximal 20 mosmol/kg.

Im Folgenden findet sich in Tabelle 5, Tabelle 6 und

Tabelle 7 eine Darstellung der Zusammensetzung der verschiedenen in den Experimenten verwendeten Lösungen.

Tabelle 5: Künstliche Liquorlösung

Substanz	Stoffmengenkonzentration (mM)	Molare Masse (g/mol)
NaCl	124,5	58,44
NaHCO₃	26	84,01
KCl	3	74,56
NaH₂PO₄	1,25	120
CaCl₂·2H₂O	2,5	147,02
MgCl₂	1,3	95,22
Glucose	10	180,16

Tabelle 6: Künstliche Liquorlösung ohne Magnesium

Substanz	Stoffmengenkonzentration (mM)	Molare Masse (g/mol)
NaCl	124,5	58,44
NaHCO ₃	26	84,01
KCl	6	74,56
NaH ₂ PO ₄	1,25	137,99
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2,5	147,02
MgCl ₂	0	0
Glucose	10	180,16

Tabelle 7: Saccharoselösung (Präparationslösung)

Substanz	Stoffmengenkonzentration (mM)	Molare Masse (g/mol)
NaCl	87	58,44
NaHCO ₃	25	84,01
KCl	2,5	74,56
NaH ₂ PO ₄	1,25	137,99
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,5	147,02
MgCl ₂	7	95,22
Glucose	10	180,16
Sucrose	75	342,3

4.2 Methoden

4.2.1 Präparation der hippocampalen Schnitte

Zur Präparation der hippocampalen Schnitte wurden die Versuchstiere mit Diethylether narkotisiert. Die entsprechende Narkosetiefe wurde mittels Halte-, Stell- und Schmerzreflex überprüft. Im Anschluss erfolgte die Dekapitation unter Verwendung einer Guillotine. Die sich anschließende Präparation des Gehirns unter geeister Präparationslösung sollte auf Grund möglicher Hypoxieschäden nicht länger als eine Minute dauern. Zunächst wurde die Kopfhaut entfernt und die Hinterhauptbeine (*Os occipitale*) mit Hilfe einer Schere durchtrennt. Im Anschluss erfolgte ein medianer Schnitt entlang der Hirnlängsfurche (*Fissura longitudinalis*), wodurch eine Teilung von Schädel und harter Hirnhaut (*Dura mater*) erfolgte. Die beiden Hälften wurden vorsichtig mit einer anatomischen Pinzette zur Seite geklappt. Daran an-

schließlich erfolgte unter Verwendung eines Skalpells die Entfernung des Kleinhirns (*Cerebellum*), da dieses für die weitere Präparation hinderlich war und für die später erfolgenden Versuche keine Anwendung fand. Nun wurde das Gehirn mit Hilfe eines gebogenen Spatels aus dem Schädel gehoben und vorsichtig auf Filterpapier transferiert, um überschüssige Präparationslösung abzuwischen und die anschließende horizontale Fixierung mit Sekundenkleber auf dem Schneidebrett zu erleichtern. Diese Schneidekammer wurde im Folgenden mit eisgekühlter Präparationslösung gefüllt und unter Carbogenbegasung in das für die Anfertigung der hippocampalen Schnitte verwendete Vibratom eingebaut. Mit einem Vortrieb von 0,7 mm/s und einer Oszillationsfrequenz von 80 Hz wurden so 400 µm dicke Schnitte für die Untersuchung der Pyramidenzellen angefertigt. Um die Qualität der hippocampalen Schnitte zu verbessern, wurde zuvor mit Hilfe einer Präzisionspipette und Feldschere die weiche Hirnhaut (*Pia mater*) entfernt. Des Weiteren wurde im Programm „Blade Alignment“ des Vibratoms die Auslenkung der Klinge in der Z-Achse minimiert.

Die fertigen Hippocampusschnitte wurden mit Hilfe einer Pipette in eine mit künstlicher Liquorlösung gefüllte und mit Carbogen begaste Aufbewahrungskammer transferiert. Hier wurden sie mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur gelagert.

4.2.2 Aufbau des elektrophysiologischen Messplatzes

Die im Anschluss an die Präparation im Rahmen der extrazellulären und intrazellulären Ableitungen durchgeführten Messungen erfolgten an einem speziell hierfür vorgesehenen Messplatz. Dessen Aufbau ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt.

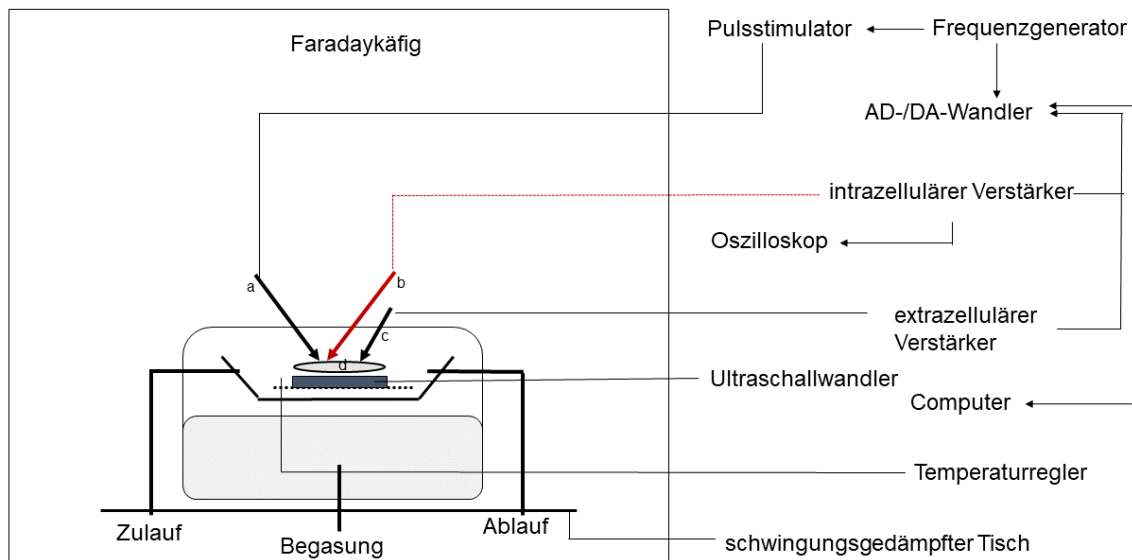


Abbildung 6: Übersichtzeichnung der zur elektrophysiologischen Ableitung verwendeten Messkammer. Diese befand sich auf einem vibrationsgedämpften Tisch innerhalb eines geerdeten Faradaykäfigs. Eine Rollerpumpe gewährleistete während der Lagerung der Schnitte in der Messkammer eine durchgehende Umspülung von mit Carbogen begaster künstlicher Liquorlösung. Ebenfalls mit der Messkammer verbunden war ein Ultraschallwandler, der über den Frequenzgenerator (Master-8) angesteuert wurde. Mittels der Stimulationselektrode (a) wurden die Gewebsschnitte des Hippocampus (d) stimuliert und die so induzierten Signale über die intrazelluläre (b) und extrazelluläre Ableitungselektrode (c) abgeleitet, entsprechend verstärkt und mittels AD-Wandler abgetastet.

Abbildung 6 zeigt die zur elektrophysiologischen Ableitung verwendete Messkammer. Diese befand sich auf einem vibrationsgedämpften Tisch innerhalb eines geerdeten Faradaykäfigs. Für die folgenden extrazellulären sowie intrazellulären Messungen wurden die jeweiligen Schnitte mittels Transferpipette auf das in der Messkammer aufgespannte Nylonnetz übertragen und dort für weitere 20 Minuten gelagert. Bei diesem Transfer konnte es trotz großer Sorgfalt sowohl zum Auftreten von Mikro- als auch kleineren Makroschäden durch Lagerung und Positionierung der Schnitte in der Ultraschall-Kammer kommen. Eine Rollerpumpe gewährleistete während der Lagerung der Schnitte in der Messkammer eine durchgehende Umspülung von mit Carbogen begaster künstlicher Liquorlösung. Diese befand sich außerhalb des Faradaykäfigs in einem Wasserbad und wurde mittels Temperaturregler sowie eines mit

der Messkammer verbundenen Temperatursensors konstant auf $32,0 \pm 0,5$ °C temperiert. Besonders in früheren Forschungsarbeiten wird die Temperaturerhöhung unter Ultraschall-Applikation als wesentliche Schädigungsquelle des Gewebes angesehen [89]. Dies spiegelte sich auch in der Qualität der Messungen wider. Durch die in der hier vorliegenden Arbeit verwendete Applikation von LIFU (*low intensity focused ultrasound*) ist eine solche temperaturbedingte Beeinträchtigung nahezu ausgeschlossen. Wie in einigen Studien diskutiert, wird lediglich bei der Verwendung von HIFU (*high intensity focused ultrasound*) eine thermische Wirkung erwartet und findet durch ihren destruktiven Prozess u.a. Anwendung in der Zerstörung unerwünschter Gewebsformationen [19]. Da die hier vorliegenden Messungen zudem unter ständiger Temperaturkontrolle durchgeführt worden sind, konnte einer möglich schädigenden Temperaturerhöhung frühzeitig entgegengewirkt werden.

Ebenfalls mit der Messkammer verbunden war ein Ultraschallwandler, der über den Frequenzgenerator (Master-8) angesteuert wurde und die Grundlage der nachfolgend beschriebenen Experimente bildete. Der optimale Frequenz- und Leistungsbereich der Messkammer mit integriertem Ultraschallwandler wurde vor Beginn der Messungen bestimmt. Eine farbkoodierte Überlagerung der Intensität der Ultraschallwirkung im Bereich der Messebene findet sich in der nachfolgenden Abbildung 7 und bildete die Grundlage für die Positionierung der Ratten-Hippocampus-Schnitte. Diese sollten im Bereich der stärksten Intensität der Ultraschallwirkung positioniert werden. In Abbildung 7 entspricht dies dem rot hinterlegten Messbereich, entsprechend einer relativen Farbskala.

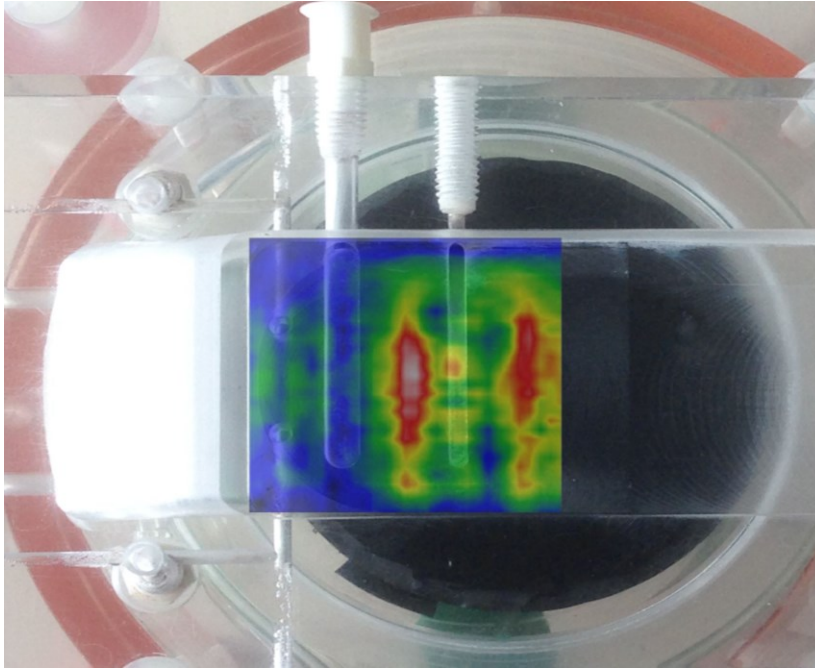


Abbildung 7: Ansicht von oben auf den Testaufbau. Dargestellt ist die Intensitätsverteilung des Ultraschalls im Bereich der Messebene. Es zeigt sich von außen nach innen eine deutliche Zunahme der Ultraschallwirkung, dargestellt durch die verschiedenen Farben, wobei „blau – geringste Intensität“ und „rot – stärkste Intensität“ (relative Farbskala) [90].

Gemäß der in Abbildung 7 angegebenen relativen Farbskala, wurden die Ratten-Hippocampus-Schnitte mittig (entspricht der rot hinterlegten Fläche) platziert. Im Rahmen der Messungen erfolgte anschließend die Ultraschallbehandlung, wobei die Leistung am Gerät auf 100 % eingestellt wurde. Dies entspricht einer Intensität von etwa 480 mW/cm^2 (vgl. Abbildung 8), wobei dieser Wert durch Extrapolation des angezeigten quadratischen Fits bestimmt wurde.

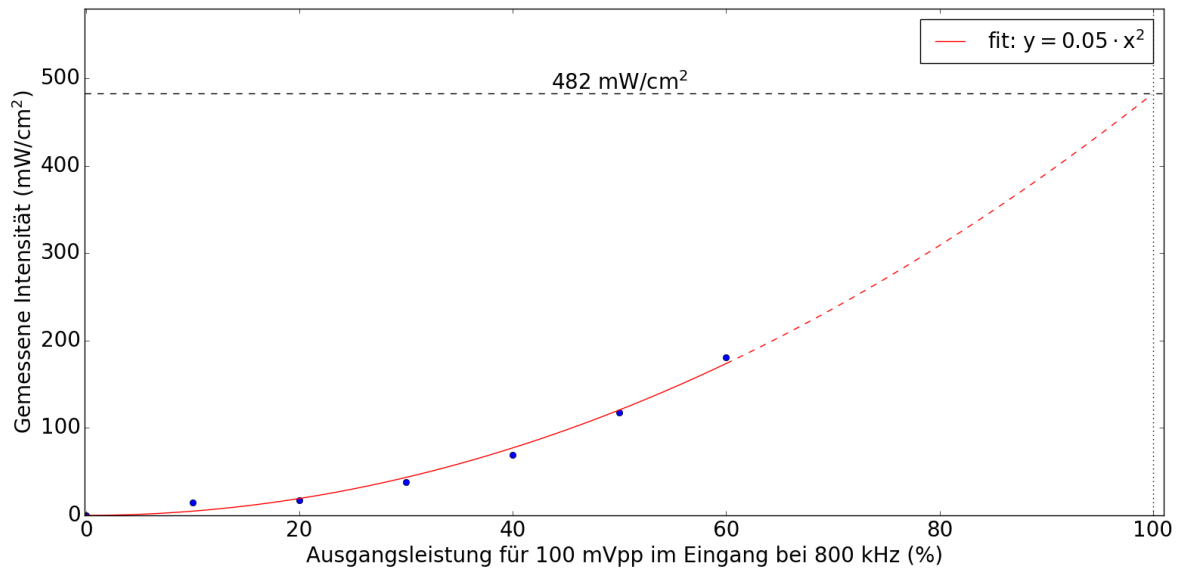


Abbildung 8: Gemessene Ultraschallintensität in Abhängigkeit der eingestellten Ausgangsleistung. Die blauen Punkte markieren die Messdaten, durch die ein quadratischer Fit gelegt wurde (durchgezogene rote Linie). Dieser wurde extrapoliert, um den Wert für 100 % Ausgangsleistung zu bestimmen [90] (Grafik eigenständig überarbeitet).

4.2.3 Verwendete Stimulationsmuster

Die in Abbildung 9 und Abbildung 10 gezeigten Stimulationsmuster stellen die angewandten Repetitionsraten des Ultraschall-Wandlers dar, die die Grundlage der durchgeführten Messprotokolle bildeten. Letztere werden im Folgenden genauer dargestellt. Alle Messungen beziehen sich auf einen Zeitraum von 30 Sekunden.

Für das Stimulationsmuster im Delta-Frequenzbereich bedeutet dies, dass die jeweiligen Ratten-Hippocampus-Schnitte alle 2 s für jeweils 1 s mit 800 kHz beschallt wurden. Bei einer Gesamtdauer von 30 s ergeben sich folglich 15 Beschallungen in 30 s.

Entsprechendes gilt für das Stimulationsprotokoll im Bereich der Gamma-Frequenz. Hier wurden die hippocampalen Schnitte zu Beginn einer Messzeit von 30 s einmalig einer Ultraschallbehandlung mit 800 kHz ausgesetzt, wobei die Repetitionsrate 50 Hz betrug.

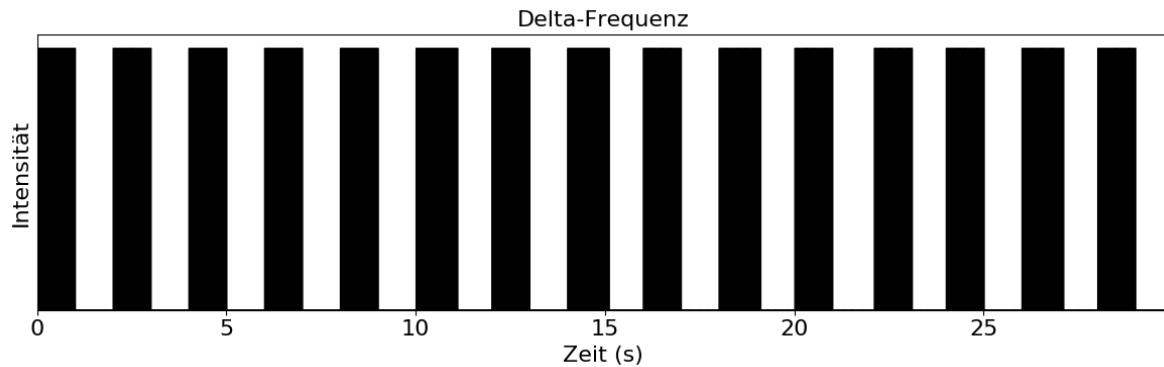


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Stimulationsmusters mit einer Repetitionsrate im Delta-Frequenzbereich. Es wird über 30 s alle 2 s ein Ultraschallpuls ($f = 800 \text{ kHz}$) mit einer Dauer von 1 s appliziert. Insgesamt ergeben sich 15 Repetitionen in 30 s.

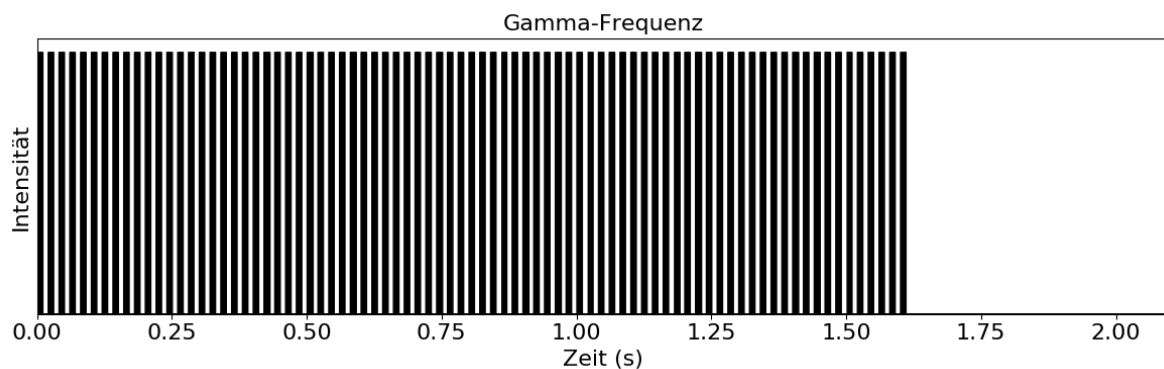


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Stimulationsmusters mit einer Repetitionsrate im Gamma-Frequenzbereich. Es werden über 1,6 s Ultraschallpulse ($f = 800 \text{ kHz}$) mit einer Repetitionsrate von 50 Hz appliziert. Insgesamt ergeben sich 80 Repetitionen in 1,6 s.

4.2.4 Extrazelluläre Ableitung

Zur extrazellulären Ableitung im Bereich des Stratum radiatum der CA1-Region der hippocampalen Schnitte wurden vor Messbeginn angefertigte Glaskapillaren aus Borosilikatröhrchen (2 - 3 M Ω) verwendet. Diese wurden mit Hilfe des Pipettenziehgeräts PIP5 hergestellt. Die Glaskapillaren wurden anschließend mit künstlicher Liquorlösung sowie einem chlorierten Silberdraht gefüllt, der so mit der Badlösung in Kontakt stand.

Die verwendeten Stimulationsprotokolle, mit deren Hilfe die Auswirkungen von Ultraschall in variierenden Zeit- und Repetitionsraten auf die Eigenschaften des hippocampalen Netzwerkes untersucht wurden, finden sich in den oben gezeigten Abbildungen (vgl. Abbildung 9 und Abbildung 10).

Zur Messung der Auswirkungen einer Ultraschallapplikation auf die Spontanaktivität des hippocampalen Netzwerkes, wurde das Magnesium mittels Badapplikation von künstlicher Li-quorlösung mit 0 Mg^{2+} aus den vorbereiteten Gehirnschnitten weitestgehend ausgewaschen. Nach ca. 30 Minuten waren genügend Rezeptoren durch das Auswaschen von Magnesium in den aktivierten Zustand übergetreten. Dadurch konnten erste spontane Entladungen beobachtet werden.

Eine Übersicht der verschiedenen Versuchsgruppen findet sich im Folgenden in Tabelle 8 aufgeführt. Die einzelnen Gruppen variierten in den verschiedenen Zeit- und Repetitionsraten des applizierten Ultraschalls. Als Kontrollgruppe diente jeweils ein Kollektiv ohne Ultraschall-Applikation (vgl. auch Abbildung 9, Abbildung 10 und Tabelle 8).

Tabelle 8: Messübersicht der Spontanaktivität

Stimulationsprotokoll	Beschreibung	Anzahl der Messungen n
Kontrolle	Keine Ultraschall-Applikation	13
Delta initial	Ultraschall-Applikation (800 kHz) nach 2,5 min mit einer Repetitionsrate von 0,5 Hz und einer Intensität von etwa 480 mW/cm ²	10
Delta final	Ultraschall-Applikation (800 kHz) nach 62,5 min mit einer Repetitionsrate von 0,5 Hz und einer Intensität von etwa 480 mW/cm ²	14
Gamma initial	Ultraschall-Applikation (800 kHz) nach 2,5 min mit einer Repetitionsrate von 50 Hz und einer Intensität von etwa 480 mW/cm ²	13
Gamma final	Ultraschall-Applikation (800 kHz) nach 62,5 min mit einer Repetitionsrate von 50 Hz und einer Intensität von etwa 480 mW/cm ²	25
		Σ 75

In Abbildung 11 findet sich zur Verdeutlichung des Messablaufs eine Übersichtszeichnung der durchgeführten Versuche zur Analyse der Spontanentladungen der jeweiligen Gehirnschnitte.

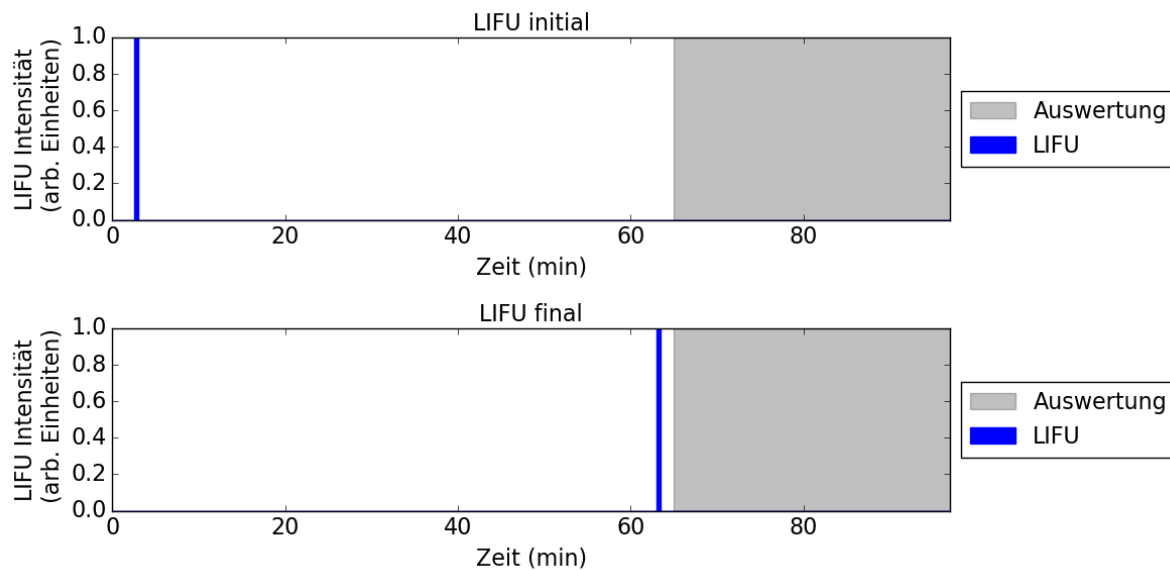


Abbildung 11: Zeitlicher Ablauf einer LIFU-Messung. Blau dargestellt ist der Zeitpunkt der Ultraschallapplikation ($f = 800 \text{ kHz}$). Bei LIFU initial erfolgt diese 2,5 min nach Messbeginn (vgl. oberer Bildabschnitt), bei LIFU final 62,5 min nach Messbeginn (vgl. unterer Bildabschnitt). Grau hinterlegt ist der Zeitbereich zwischen 65 min und 95 min, für den die entsprechenden Messdaten ausgewertet wurden

Wie in Abbildung 11 verdeutlicht, erfolgte die Ultraschall-Behandlung entweder nach 2,5 min oder nach 62,5 min. Inwiefern sich der Zeitpunkt der Ultraschallapplikation auf die Spontanaktivität der jeweiligen Gehirnschnitte auswirkt, ist Gegenstand der Diskussion.

Zur Ermittlung der synaptischen Transmission zwischen den Schaffer-Kollateralen und den Pyramidenzellen wurden sogenannte Eingangs-Ausgangs Kurven generiert. Hierbei erfolgte mit Hilfe eines Frequenzgenerators und eines Pulsstimulators eine monopolare Doppelpulsstimulation mit einem Pulsabstand von 40 ms. Dies wurde alle 30s wiederholt und die Stimulationsintensität schrittweise erhöht (vgl. Abbildung 12).

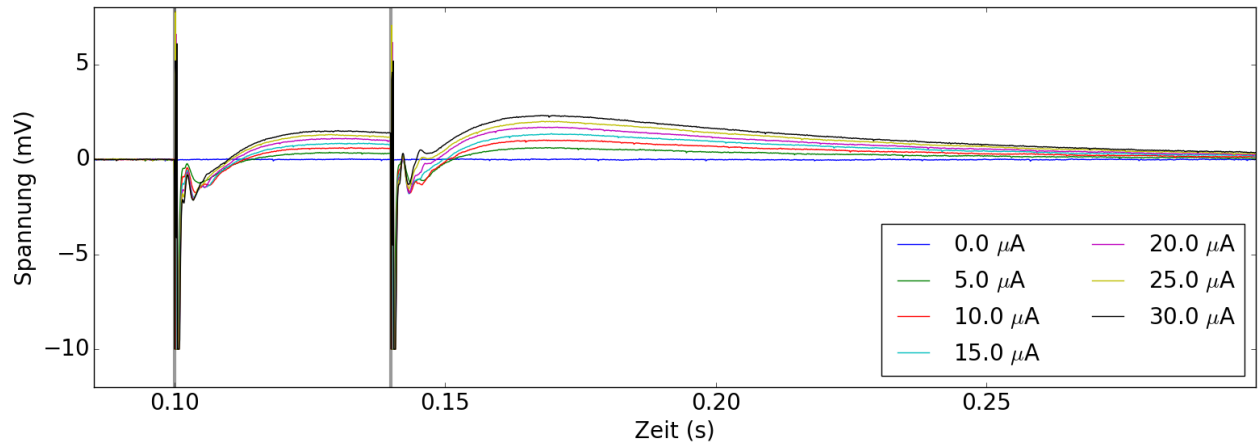


Abbildung 12: Darstellung einer Eingangs-Ausgangs Messung an Ratten-Hippocampus-Schnitten im Bereich der CA1-Region. Die senkrechten grauen Balken markieren den Zeitpunkt der Stimulation bei $t = 0,10$ s und $t = 0,14$ s. Stimuliert wurde von $0 \mu\text{A}$ bis $30 \mu\text{A}$ in $2,5 \mu\text{A}$ -Schritten, wobei hier aus Gründen der Übersichtlichkeit nur jede zweite Kurve dargestellt ist.

Der Rangbereich der Stimulation betrug 1 mA und wurde von $0 \mu\text{A}$ bis $30 \mu\text{A}$ in $2,5 \mu\text{A}$ -Schritten stetig gesteigert. Die evozierten fEPSP (*field excitatory postsynaptic potential*) wurden mittels Extrazellulärverstärker verstärkt, mittels Tiefpassfilter bei $1,3 \text{ kHz}$ gefiltert sowie über einen Analog-Digital-Wandler mit einer Abtastrate von 10 kHz und der Software *Signal* (Vers. 2.16, Cambridge Electronic Design, Cambridge, England) auf einem Computer bis zur weiteren Auswertung digitalisiert und gespeichert. Eine Übersicht der verwendeten Versuchsprotokolle findet sich im Folgenden aufgeführt (vgl. Tabelle 9)

Die einzelnen Gruppen variierten in den verschiedenen Zeit- und Repetitionsraten des applizierten Ultraschalls. Als Kontrollgruppe diente jeweils ein Kollektiv ohne wirksame Ultraschall-Applikation (vgl. auch Abbildung 9 und Abbildung 10).

Tabelle 9: Messübersicht der Eingangs-Ausgangs Messungen

Stimulationsprotokoll	Beschreibung	Anzahl der Messungen n
Kontrolle	Ultraschall-Applikation mit 0 % Leistung zwischen zwei Messzyklen	9
Delta - Protokoll	Ultraschall-Applikation (800 kHz) mit einer Repetitionsrate von 0,5 Hz zwischen zwei Messzyklen und einer Intensität von etwa 480 mW/cm ²	5
Gamma - Protokoll	Ultraschall-Applikation (800 kHz) mit einer Repetitionsrate von 50 Hz zwischen zwei Messzyklen und einer Intensität von etwa 480 mW/cm ²	7
		Σ 21

4.2.5 Intrazelluläre Ableitung

Die für die intrazellulären Ableitungen verwendeten scharfen Mikroelektroden aus Borosilikatröhrchen wurden mit Hilfe des horizontalen Pipettenziehgerätes P-97 vor Messbeginn hergestellt und mit einer Lösung aus 3 M Kaliumacetat sowie 0,3 M Kaliumchlorid gefüllt. In diese wurde anschließend ein chlorierter Silberdraht eingeführt. Dies musste mit großer Sorgfalt geschehen, da bereits minimale Substanzabscherungen zu einer Polarisierung des Drahtes führten, wodurch die anschließend durchgeführten Messungen verfälscht werden konnten.

Der Widerstand der Glasmikrokapillaren war ebenfalls von besonderer Bedeutung, da er ein indirektes Maß für den Spitzendurchmesser darstellte. Er lag bei mindestens 60 MΩ und maximal 130 MΩ. Widerstände außerhalb dieses angegebenen Bereichs zeigten sich als für die Messungen nicht verwertbar. Entsprechende Pipetten wurden daher verworfen.

Die abgeleiteten Spannungen wurden mit Hilfe eines Intrazellulärverstärkers verstärkt, mittels Tiefpassfilter bei 3 kHz gefiltert, sowie über einen Analog-Digital-Wandler bei einer Abtast-rate von 10 kHz und der *Signal 2.1.6 Software* (Cambridge Electronic Design, Cambridge,

England) auf einem Personalcomputer bis zur weiteren Auswertung digitalisiert und gespeichert.

Wie zuvor bei den extrazellulären Ableitungen beschrieben, erfolgten auch die Messungen mit scharfen Mikroelektroden unter konstanten Temperaturbedingungen bei $32,0 \pm 0,5$ °C.

Die Positionierung der Messelektrode erfolgte mit Hilfe eines Stereomikroskops im Bereich des Stratum pyramidale der CA1-Region der vorbereiteten horizontalen hippocampalen Schnitte.

Mit Hilfe eines motorgetriebenen Mikromanipulators wurde die Messelektrode nach Kompensation der Pipettenkapazität und des Pipettenwiderstandes in 2 µm-Schritten und mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/s durch den zuvor beschriebenen Messbereich bewegt.

Erstes Zeichen eines Kontaktes zwischen einer Zelle und der Pipettenspitze stellte eine Vergrößerung des Eingangswiderstands dar. Die darauffolgende Penetration äußerte sich in einer unmittelbaren Entladung von Aktionspotentialen. Da die Penetration der Zellmembran mit einer Verletzung dieser einherging, musste zur Stabilisierung des Membranpotentials zunächst ein hyperpolarisierender Haltestrom induziert werden, bis sich das Loch zwischen Pipettenspitze und Zellmembran geschlossen hatte. Dieser lag erfahrungsgemäß zu Beginn bei etwa -1,35 nA und wurde im Verlauf einer sich anschließenden 10-minütigen Regenerationsphase immer weiter reduziert. Im Anschluss wurde das Ruhemembranpotential ohne hyperpolarisierenden Haltestrom bestimmt. Dieses sollte für die folgenden elektrophysiologischen Messungen bei mindestens -55 mV liegen. War dies nicht der Fall, so wurde die Zelle verworfen. Für die sich anschließenden intrazellulären Ableitungen wurde das Membranpotential der Pyramidenzellen durch intrazelluläre Strominjektion auf etwa -70 mV stabilisiert.

4.2.5.1 Erstellung von Strom-Spannungs-Sprüngen

Zur näheren Bestimmung der passiven elektrotonischen und aktiven Membraneigenschaften der Pyramidenzellen wurden sogenannte Strom-Spannungs-Sprünge induziert. Hierbei wurde jeweils über 600 ms über die Stimulationselektrode ein Strom injiziert, der in Schritten von 0.1 nA von -1 nA bis 1 nA erhöht wurde (siehe Abbildung 13).

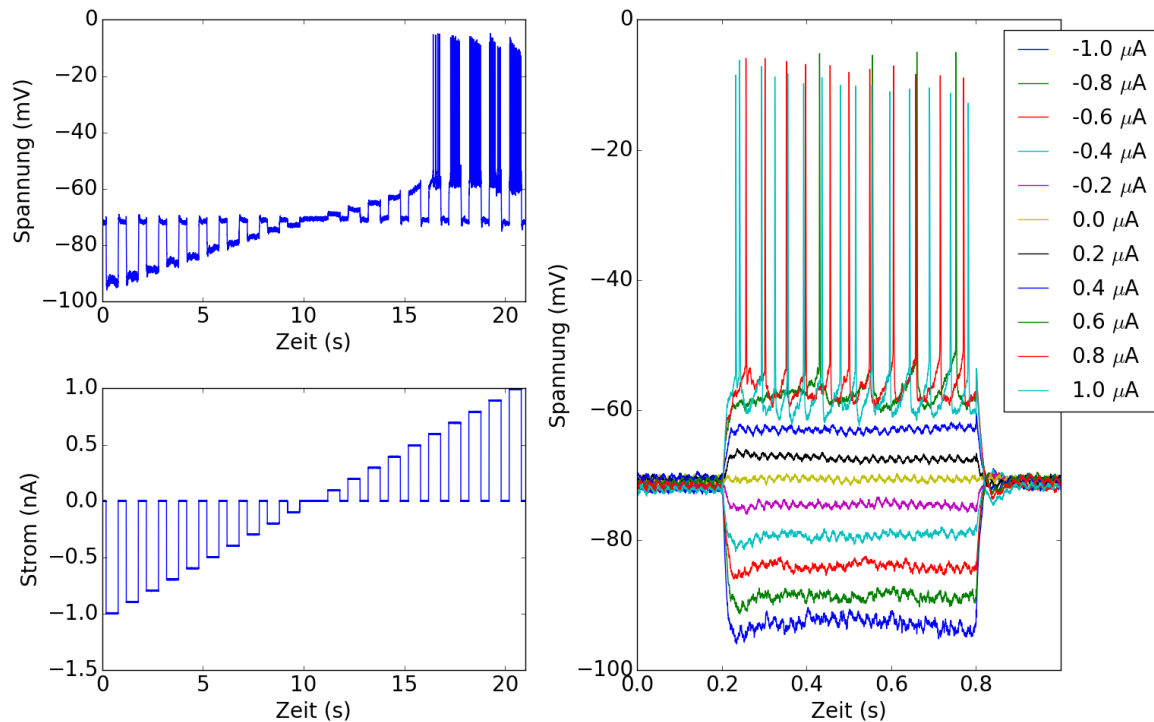


Abbildung 13: Zusammenfassende Darstellung eines Messablaufs der Strom-Spannungs-Sprünge von -1 nA - 1 nA über je 600 ms . Links im Bild ist das Antwortverhalten der Zelle (vgl. oberer Bildabschnitt) in Abhängigkeit von der Stimulation (vgl. unterer Bildabschnitt) über die Zeit dargestellt. Nach 10 Stimulationen erfolgt der Umschlag von hyperpolarisierender Strominjektion zu depolarisierender Strominjektion. Mit zunehmender depolarisierender Strominjektion zeigt sich ein verstärktes Entladungsverhalten der Zelle. In der rechten Bildhälfte sind die gemessenen Spannungskurven übereinander aufgetragen, wobei aus Gründen der Übersichtlichkeit nur jede zweite Kurve dargestellt ist.

Das Verhältnis von gemessenem Membranpotential zu injiziertem Strom gab hierbei Auskunft über den Membranwiderstand. Des Weiteren konnte durch die Hyperpolarisation der Zellmembran die Membranzeitkonstante τ sowie die durch HCN-Kanäle generierte und als „Spannungseinbruch“ bezeichnete Depolarisation näher charakterisiert werden. Auch die Nachhyperpolarisation nach depolarisierender Strominjektion konnte untersucht werden (vgl. auch Abbildung 14 und Abbildung 15 sowie Tabelle 10).

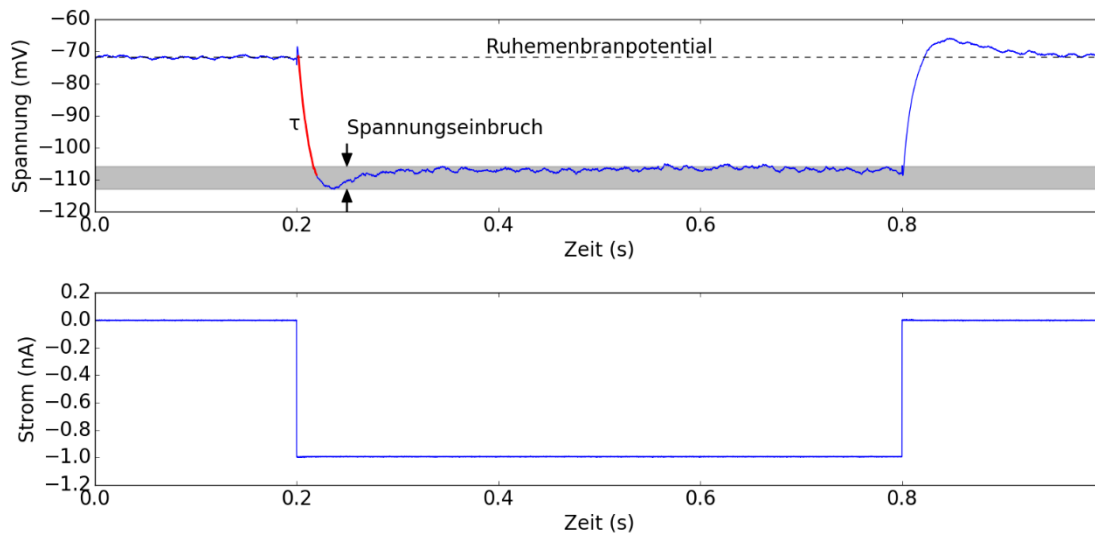


Abbildung 14: Darstellung einer hyperpolarisierenden Messung. Vor Beginn der Stimulation liegt die Zelle auf dem Ruhemembranpotential. Die bei 0,2 s einsetzende Stimulation sorgt für einen Einbruch des Potentials, welches einen exponentiellen Abfall mit der Zeitkonstante τ aufweist. Die Differenz zwischen der maximalen Hyperpolarisation und dem sich dann einstellenden Membranpotential wird als "Spannungseinbruch" bezeichnet.

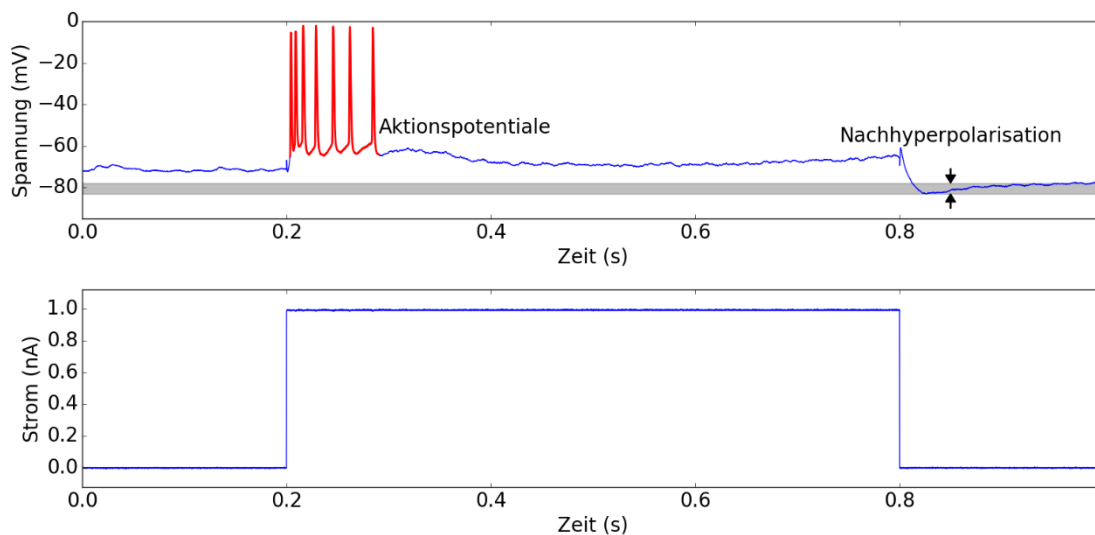


Abbildung 15: Darstellung einer depolarisierenden Messung. Als Reaktion auf die bei 0,2 s einsetzende Stimulation wird die Zelle depolarisiert und beginnt zu feuern ("Aktionspotentiale"). Nach dem Ende der Stimulation sinkt das Potential wieder auf das Ruhemembranpotential ab, wobei der hierbei auftretende Unterschwinger als Nachhyperpolarisation bezeichnet wird.

Tabelle 10: Übersicht der passiven elektrotonischen und aktiven Membraneigenschaften

Membraneigenschaft	Definition
Ruhemembranpotential (RMP)	Spannungsdifferenz einer Zelle zwischen Intra- und Extrazellulärraum, die sich durch ein Gleichgewicht an Ionenströmen (bes. K^+) in Ruhe einstellt
Membranwiderstand (R)	Anstieg der Strom-Spannungs-Kennlinie
Membranzeitkonstante τ	Zeitlicher Abstand vom Beginn der Stimulation bis zum Erreichen von 63,2% der maximalen Hyperpolarisation
Spannungseinbruch	Differenz zwischen dem Membranpotential bei maximaler Hyperpolarisation und dem durch Hyperpolarisation getriggerten Einwärtsstrom
Nachhyperpolarisation	Durch Depolarisation getriggerte maximale Hyperpolarisation
Salve von Aktionspotentialen (engl. <i>burst</i>)	Mehrere aufeinanderfolgende Aktionspotentiale

Wie zuvor in den extrazellulären Ableitungen dargestellt, dienten die verschiedenen Versuchsprotokolle als Grundlage der durchgeführten Messungen. Die im Folgenden dargestellte Tabelle 11 fasst die Versuche zusammen. Als Kontrollgruppe diente eine Ultraschall-Applikation mit 0 % Leistung.

Tabelle 11: Messübersicht der intrazellulären Strom-Spannungs-Sprünge- und Spike Messungen

Stimulationsprotokoll	Beschreibung	Anzahl der Messungen n
Kontrolle	Ultraschall-Applikation (800 kHz) mit 0 % Leistung nach einmalig durchgeführter Strom-Spannungs-Sprünge-Messung ohne Stimulation; Aufzeichnung von 4 Messungen nach Ultraschall-Applikation: 0 min, 5 min, 10 min und 15 min	10
Delta - Protokoll	Ultraschall-Applikation (800 kHz) mit einer Intensität von etwa 480 mW/cm ² und einer Repetitionsrate von 0,5 Hz nach einmalig durchgeführter Strom-Spannungs-Sprünge-Messung ohne Stimulation; Aufzeichnung von 4 Messungen nach Ultraschall-Applikation: 0 min, 5 min, 10 min und 15 min	6
Gamma - Protokoll	Ultraschall-Applikation (800 kHz) mit einer Intensität von etwa 480 mW/cm ² und einer Repetitionsrate von 50 Hz nach einmalig durchgeführter Strom-Spannungs-Sprünge-Messung ohne Stimulation; Aufzeichnung von 4 Messungen nach Ultraschall-Applikation: 0 min, 5 min, 10 min und 15 min	6
		Σ 22

4.2.5.2 Untersuchung von Aktionspotentialen

Im Rahmen dieser Messung wurden Einfachentladungen generiert, die es ermöglichten, die Eigenschaften der einzelnen Aktionspotentiale in Bezug auf eine Ultraschall-Applikation variierender Stimulationsparameter zu analysieren. Zur Bestimmung des Schwellenpotentials wurde die jeweilige Zelle im Intervall von 2,5 s durch kurze Strominjektionen über 7 ms erregt. Eine übersichtliche Darstellung der untersuchten Parameter findet sich in der nachfolgenden Abbildung 16

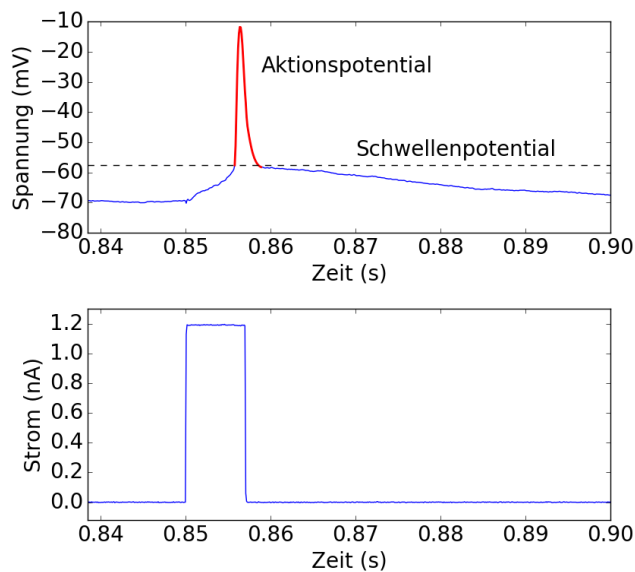


Abbildung 16: Darstellung einer Aktionspotentialmessung. Wurde eine Zelle über 7 ms mit einer Stimulationsstärke von 1,2 nA erregt, so reagierte sie ab einem bestimmten Schwellenpotential (vgl. die eingezeichnete gestrichelte Linie) mit der Generierung eines Aktionspotentials (rot dargestellt).

Eine genaue statistische Analyse der sich aus den jeweiligen Daten ergebenden Werte findet sich im Ergebnisteil. Wie in Abbildung 16 dargestellt, wurde hierbei besonders das Schwellenpotential für die statistische Auswertung beachtet.

Die verwendeten Versuchsprotokolle entsprechen, wie auch die verwendeten Zellen, den zuvor in Tabelle 11 aufgeführten Beschreibungen für die Strom-Spannungs-Sprünge-Messungen.

4.3 Auswertung und Statistik

Zur statistischen Auswertung und Aufarbeitung der Daten wurden die Programme Excel 2011 und SPSS 25 sowie die Python-Bibliotheken NumPy, SciPy und Pyplot verwendet.

Die Angaben zum arithmetischen Mittelwert (\bar{x}), der Standardabweichung (SD) sowie der Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) erfolgten nach den folgenden Formeln:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

$$SD = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

$$SEM = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

Mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests (U-Test) [91] bzw. des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests [92] wurden die verschiedenen Messprotokolle miteinander verglichen.

Ein signifikanter Unterschied wurde für $p \leq 0,05$ angenommen und mit einem * gekennzeichnet. Eine genauere Darstellung der jeweiligen Daten findet sich im Ergebnisteil.

4.3.1 Auswahl und Statistik der Spontanaktivität

Die Auswertung der durch Magnesiumauswaschung induzierten Aktivität erfolgte durch das Auszählen der Entladungen der horizontalen Hirnschnitte nach Induktion von Spontanaktivität gemäß der oben beschriebenen Methode. Waren 40 Minuten nach Auswaschen von Magnesium keine spontanen Entladungen zu vermerken, wurde die Messung verworfen. Berücksichtigt wurden nur solche Entladungen, deren maximaler Ausschlag mindestens dem dreifachen der Baseline entsprach. Diese wurde zu Beginn der Messung als „Rauschen“ an einem Messintervall von 30 s ohne Spontanentladung als Amplitude zwischen Minimum und Maximum stellvertretend für die ganze Messung bestimmt (vgl. Abbildung 20).

Eine Messung musste mindestens 95 Minuten andauern, um in die statistische Auswertung einzugehen.

Zur statistischen Darstellung der erzielten Ergebnisse fand der U-Test von Mann und Whitney Anwendung. Für jedes Messprotokoll (Kontrolle, LIFU initial Gamma, LIFU final Gamma, LIFU initial Delta, LIFU final Delta) wurden die Messergebnisse differenziert nach Einfa-

chentladung, Mehrfachentladung und Anfall. Eine genauere Definition der verwendeten Parameter findet sich in Tabelle 12. Anschließend finden sich in Abbildung 17 ausgewählte Beispielspuren.

Tabelle 12: Definition extrazellulärer Messparameter

Klassifikation	Erläuterung
<i>Einfachentladung</i>	Eine einfache Entladung
<i>Mehrfachentladung</i>	Drei direkt aufeinanderfolgende Entladungen oder besonders breite einzelne Entladungen, die nicht der Definition <i>Einfachentladung</i> entsprechen
<i>Anfall</i>	Dicht aufeinanderfolgende Entladungen, die nicht mehr als einzelne Entladungen identifizierbar sind. Als Anfall wurden alle <i>Mehrfachentladungen</i> gewertet, deren Dauer 2 s oder mehr betrug und mit einer sich anschließenden Refraktärzeit einher gingen

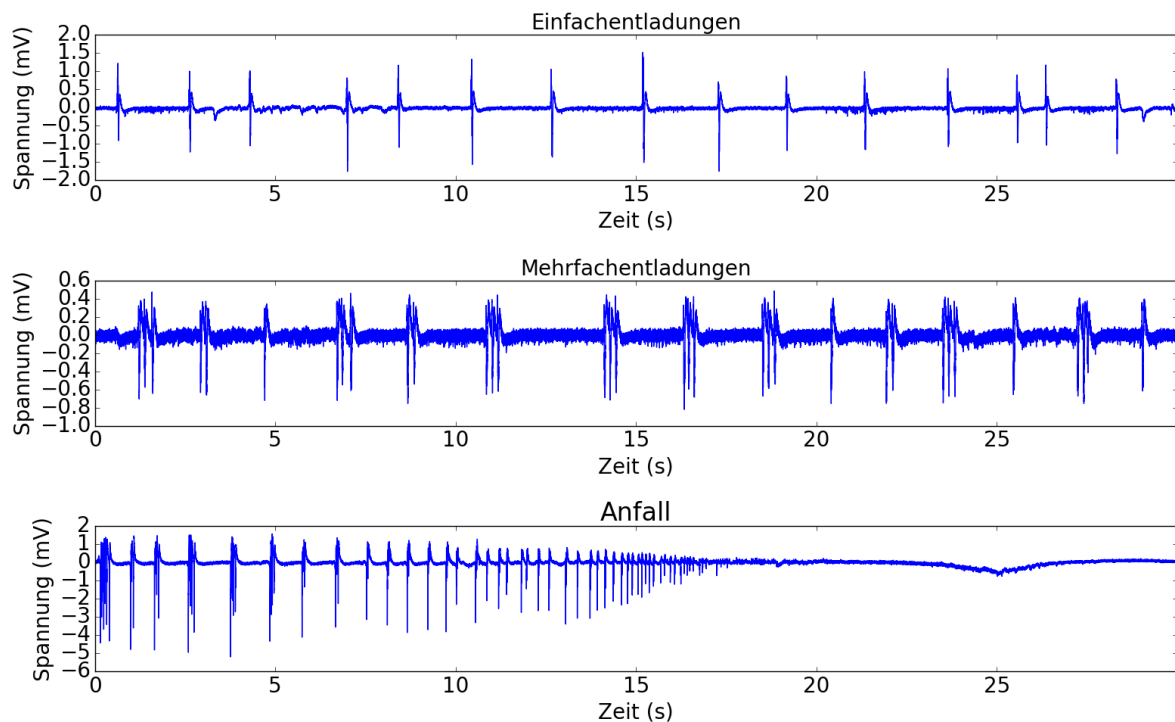


Abbildung 17: Beispielspuren für Spontanentladungen. Von oben nach unten: Einfachentladung; Mehrfachentladung; Anfall. Vgl. hierzu auch Tabelle 12.

Wie in Abbildung 17 dargestellt, zeigten die einzelnen Hirnschnitte nach Auswaschen von Magnesium Unterschiede bezüglich ihres Entladungsverhaltens. Die im späteren Verlauf der Arbeit dargestellte Auswertung berücksichtigte daher die variierenden Entladungsverhalten in Abhängigkeit des jeweils angewandten Messprotokolls. Für die anschließende statistische Analyse wurden die Messdaten im Bereich von 65 bis 95 Minuten gemittelt und - wie bereits dargestellt - über den U-Test miteinander verglichen.

4.3.2 Auswahl und Statistik der Doppelpulsstimulation

Für die statistische Analyse wurde das Doppelpulsverhältnis (PPR, engl. *paired-puls ratio*) der fEPSP betrachtet. Charakteristisch für Pyramidenzellen ist eine Doppelpulsbahnung. Die Analyse der Messwerte erfolgte über eine Normierung der Daten auf 100% vor Ultraschall-Applikation während der Kurvenverlauf nach LIFU hierzu ins Verhältnis gesetzt wurde. Analysiert wurde sowohl das Doppelpulsverhältnis der Amplitude als auch der Steigung, wie es in der folgenden Abbildung 18 dargestellt ist.

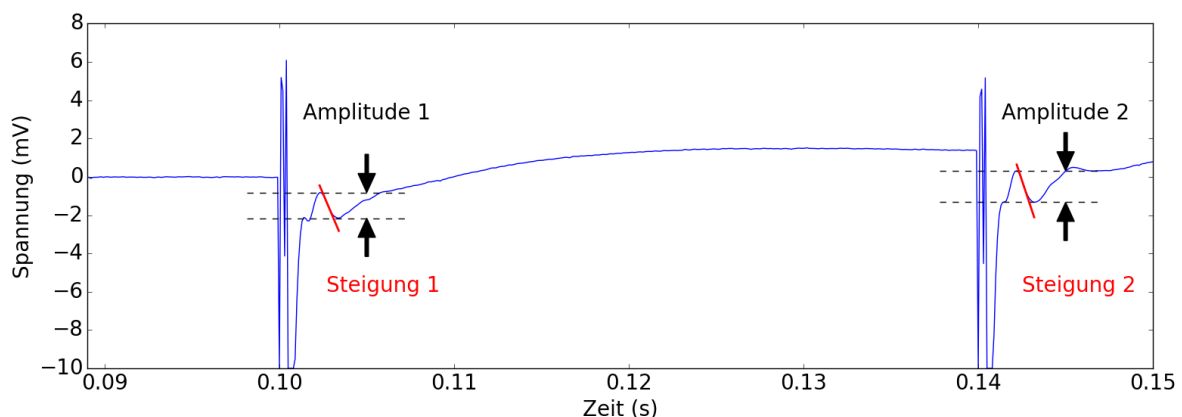


Abbildung 18: Beispielspur der Doppelpulsstimulation. Der Bereich zwischen den gestrichelten Linien markiert jeweils die Amplitude, die roten Linien die minimale Steigung.

4.3.3 Auswahl und Auswertung der Strom-Spannungs-Sprünge

Mit Hilfe der Strom-Spannungs-Sprünge wurden die bereits in Tabelle 10 dargestellten passiven und aktiven Membraneigenschaften ermittelt. Die jeweiligen Datensätze werden im Ergebnisteil näher erläutert.

Der Membranwiderstand ergibt sich hierbei als Steigung der Strom-Spannungs-Kennlinie

($f(x) = mx + c$; mit m : = Steigung). Zur Erstellung dieser Kurven wurde der injizierte hyperpolarisierende Strom (nA) gegen das Membranpotential (mV) aufgetragen. Hierbei wurden nur die hyperpolarisierenden Ströme betrachtet, da andernfalls auftretende Aktionspotentiale die Bestimmung des Membranpotentials erschweren.

Zur Berechnung der Nachhyperpolarisation wurden die Minima nach einer depolarisierenden Strominjektion vom eigentlichen Ruhemembranpotential abgezogen. Wie auch bei der Ableitung der extrazellulär gemessenen spontanen Aktivität wurde das Rauschniveau einer Messung ermittelt. Dies wurde als Amplitude zwischen Minimum und Maximum bei einer Strominjektion von 0 nA gewertet und von den anderen Werten abgezogen. Abbildung 19 und Abbildung 20 veranschaulichen das angewendete Auswertungsverfahren.

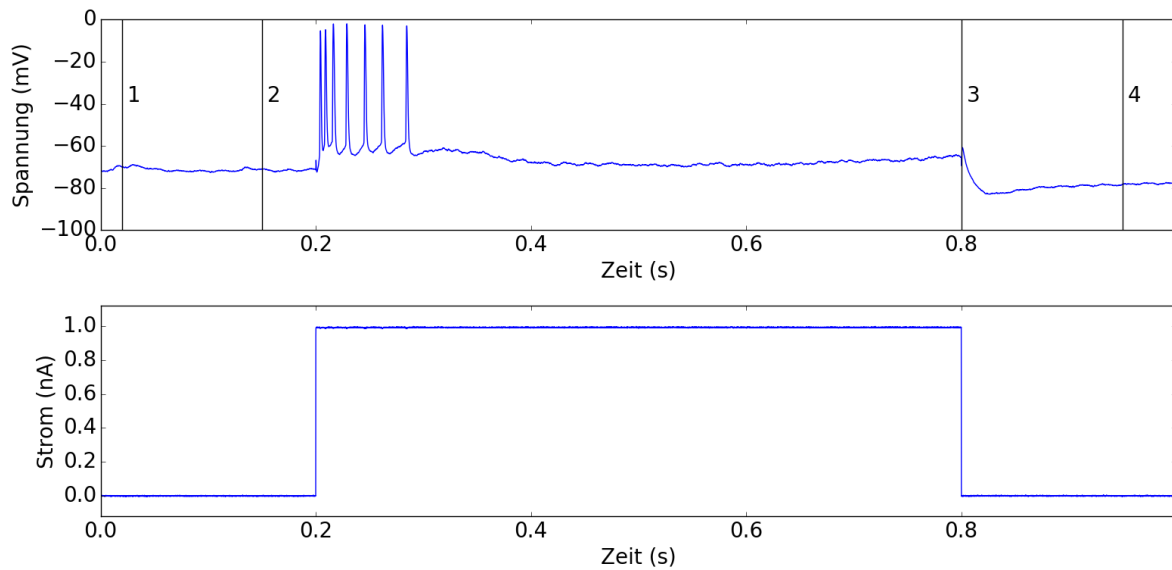


Abbildung 19: Bestimmung der Nachhyperpolarisation (AHP). Im unteren Bildabschnitt findet sich eine Darstellung des injizierten Rechteckstroms von 1 nA. Im oberen Bildabschnitt ist die Reaktion der Zelle auf diese maximale Depolarisation dargestellt. Für die Bestimmung der Nachhyperpolarisation wird das Minimum zwischen Cursor 3 und 4 bestimmt und vom Ruhemembranpotential (Minimum zwischen Cursor 1 und 2) abgezogen.

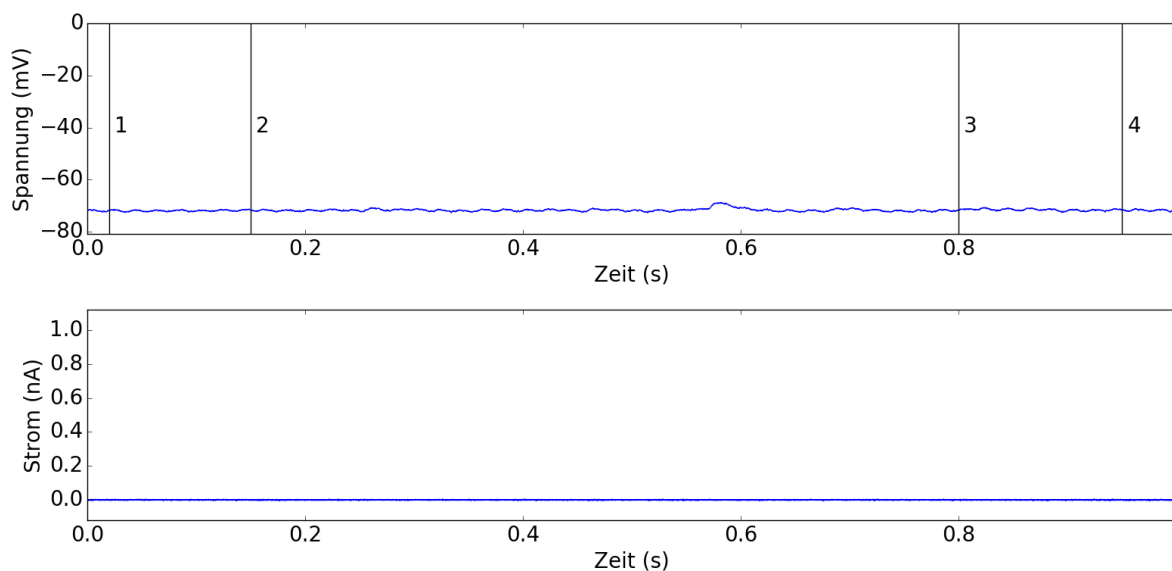


Abbildung 20: Bestimmung des Rauschniveaus einer Messung. Im unteren Bildabschnitt ist eine Strominjektion von 0 nA dargestellt. Im oberen Bildabschnitt zeigt sich die jeweilige Reaktion der Zelle bei fehlender Stimulation. Das Rauschniveau ergibt sich als Differenz zwischen dem Maximum von Cursor 3 und 4 sowie dem Minimum von Cursor 1 und 2.

Die Bestimmung des Spannungseinbruchs erfolgte ähnlich derjenigen der Nachhyperpolarisation. Hierfür wird das Membranpotential am Ende einer hyperpolarisierenden Strominjektion vom Anfang mit der eigentlichen Senke abgezogen. Das Rauschverhältnis wurde wie zuvor bei der Nachhyperpolarisation beschrieben berücksichtigt. Auf Grund sich ändernder Pipeteneigenschaften, die teilweise ein Absinken des Kurvenverlaufes gegen Ende einer Strominjektion bewirkten, mussten die Cursor zur Ermittlung der Hyperpolarisation ohne Senke leicht Richtung Mitte der Messung verschoben werden. Hier wurde dann, anders als sonst üblich, nicht das Minimum, sondern das Maximum bestimmt, welches in die spätere Berechnung der Spannungssenke einbezogen wurde (vgl. Abbildung 21).

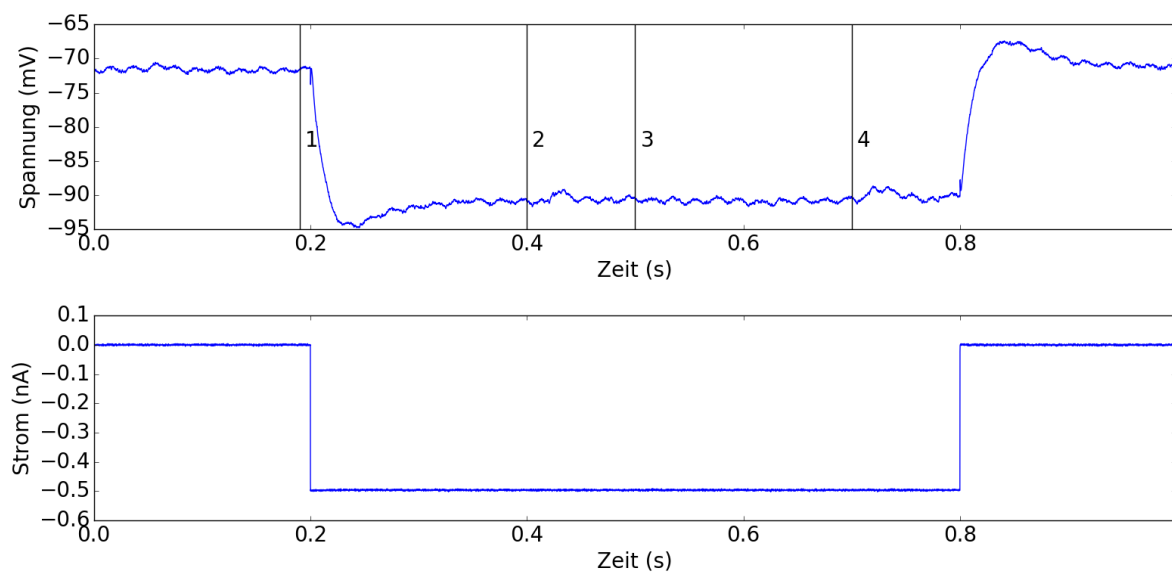


Abbildung 21: Darstellung der Bestimmung des Spannungseinbruchs (eng. sag). Im unteren Bildabschnitt findet sich eine Darstellung des injizierten Rechteckstroms bei -1 nA . Im oberen Bildabschnitt ist die Reaktion der Zelle auf diese maximale Hyperpolarisation dargestellt. Durch die Bestimmung des Minimums zwischen Cursor 1 und 2 konnte die Stärke des Spannungseinbruchs bestimmt werden. Als Bezugspunkt wurde das Maximum zwischen Cursor 3 und 4 genommen (maximale Hyperpolarisation ohne ‚Senke‘).

Des Weiteren wurden die Aktionspotentiale für die depolarisierenden Strominjektionen vor und nach Ultraschallapplikation durch Auszählen ausgewertet. Die Membranzeitkonstante τ wird über den exponentiellen Spannungsabfall bei einer hyperpolarisierenden Strominjektion bestimmt. Die Zeitkonstante ist dabei die Zeit, in der die Spannung um $1/e$ ($\sim 63,2 \%$) abfällt. Die entsprechend angewandte Auswertung wird in Tabelle 10 erläutert.

4.3.4 Auswahl und Auswertung der Schwellenpotentiale

In die Auswertung und Statistik der Schwellenpotentiale wurden nur solche Zellen einbezogen, die bereits zuvor in den Strom-Spannungs-Messungen Verwendung fanden.

5 Ergebnisse

Im nachfolgenden Teil werden die Ergebnisse der verschiedenen Messungen graphisch dargestellt und erläutert, bevor sie im anschließenden Kapitel 6 eingehend diskutiert werden.

5.1 Extrazelluläre Ableitung

Im Rahmen dieser Messungen wurde der Einfluss der verschiedenen Stimulationsmuster auf die Spontanaktivität der Ratten-Hippocampus-Schnitte untersucht (vgl. Tabelle 8 und Tabelle 9).

5.1.1 Extrazelluläre Ableitung der Spontanaktivität

Um den Einfluss der Ultraschallapplikation auf die Spontanaktivität der Gewebeschnitte zu untersuchen, wurden insgesamt 75 Messungen durchgeführt (vgl. Tabelle 8).

In Abbildung 22 sind Beispielspuren für die verschiedenen Versuchsprotokolle dargestellt.

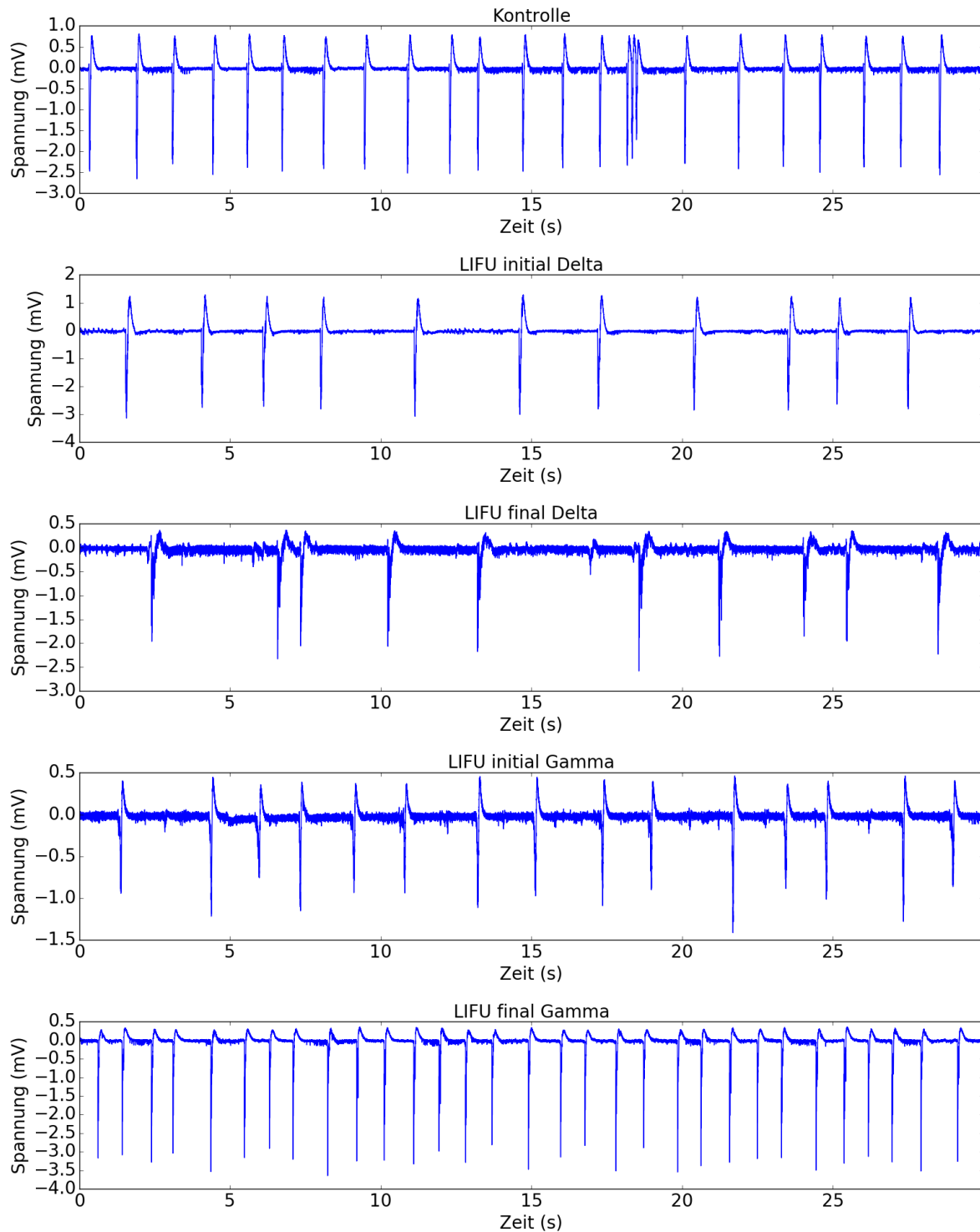


Abbildung 22: Beispielspuren der extrazellulären Spontanentladungen. Die jeweiligen Hirnschnitte wurden entweder 2,5 min nach Messbeginn einer Ultraschallapplikation von 800 kHz und einer Repetitionsrate im Delta- oder Gamma-Frequenzbereich ausgesetzt (vgl. hierzu die Bildabschnitte LIFU initial Delta und LIFU initial Gamma) oder gegen Ende einer Messung nach 62,5 min. Zu diesem Zeitpunkt waren die jeweiligen Gewebsschnitte bereits spontan aktiv (vgl. hierzu die Bildabschnitte LIFU final Delta sowie LIFU final Gamma).

Abbildung 22 zeigt anhand von Beispielspuren deutliche Änderungen des Entladungsverhaltens der jeweiligen Gewebeschnitte.

In der graphischen Darstellung von Abbildung 23 bis Abbildung 25 werden die Ergebnisse der entsprechenden Messprotokolle aufgeführt und der Einfluss der Ultraschallapplikation statistisch ausgewertet. Hierbei wurde jeweils die Anzahl der Spontanentladungen bestimmt. Zur statistischen Analyse wurden die Messdaten eines Protokolls zu den entsprechenden Zeitpunkten zwischen 65 min und 95 min jeweils über alle Gewebeproben gemittelt, um anschließend verglichen werden zu können. Analysiert wurde sowohl das Entladungsverhalten der Hirnschnitte insgesamt (vgl. Abbildung 23) als auch das Verhalten der Einfachentladungen (vgl. Abbildung 24) bzw. Mehrfachentladungen (vgl. Abbildung 25) nach LIFU im Vergleich zur Kontrollgruppe in Abhängigkeit des jeweils zu Grunde liegenden Messprotokolls.

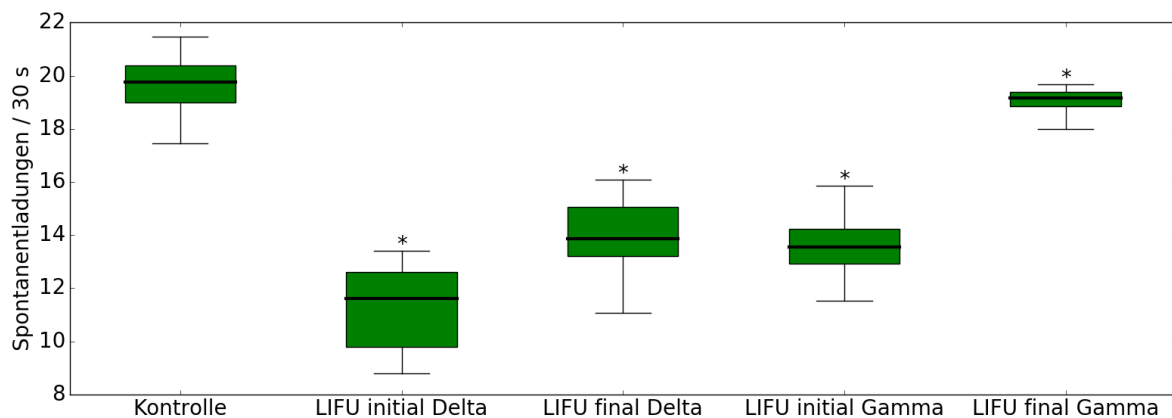


Abbildung 23: Zusammenfassende Darstellung der Spontanentladungen / 30 s. In der Kontrollgruppe zeigen sich im Median etwa 20 Entladungen / 30 s, während in den ultraschallbehandelten Gruppen eine signifikante Verminderung ($p \leq 0,05$) dieser spontanen Entladungen im Vergleich zur Kontrollgruppe zu beobachten ist. Kontrolle $n = 13$, LIFU initial Delta $n = 10$, LIFU final Delta $n = 14$, LIFU initial Gamma $n = 13$, LIFU final Gamma $n = 25$. \top oberer Whisker; \perp unterer Whisker; — Median. Signifikanzen sind mit einem * gekennzeichnet.

Abbildung 23 zeigt eine signifikante Reduzierung der Gesamtanzahl an Entladungen bei Ultraschallapplikation im Delta-Frequenzbereich zu Beginn der Messungen (vgl. LIFU initial Delta), wobei $p \leq 0,05$. Eine entsprechende Ultraschallapplikation zum Ende der Messung (vgl. LIFU final Delta) reduziert die Spontanaktivität der Zellen um etwa 6 Entladungen / 30 s im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch diese Veränderung ist mit $p \leq 0,05$ im U-Test nach

Mann-Whitney signifikant und in der obigen Abbildung 23 mit einem * gekennzeichnet. Eine Ultraschall-Applikation im Gamma-Frequenzbereich bewirkt vorrangig initial eine Verminderung der spontanen Entladungen, wie sie in der oberen Abbildung 23 dargestellt ist. Die Änderung gleicht der Messgruppe LIFU final Delta und ist mit $p \leq 0,05$ ebenfalls signifikant. Gegen Ende applizierter Ultraschall im Gamma-Frequenzbereich (vgl. LIFU final Gamma in Abbildung 23) zeigt weniger starke Abweichungen. Dennoch zeigen sich auch diese im U-Test signifikant, wobei $p \leq 0,05$.

Um eine Aussage darüber treffen zu können, in wie weit sich die Verminderung der Spontanentladungen in den mit Ultraschall ($f = 800 \text{ kHz}$) behandelten Gruppen bei verschiedenen Repetitionsmustern in ihrer Gesamtheit auf die beiden Untergruppen der Einfachentladungen sowie Mehrfachentladungen aufteilt, wurde dieses im weiteren Verlauf analysiert. Eine graphische Darstellung findet sich in den beiden folgenden Abbildungen (vgl. Abbildung 24 und Abbildung 25).

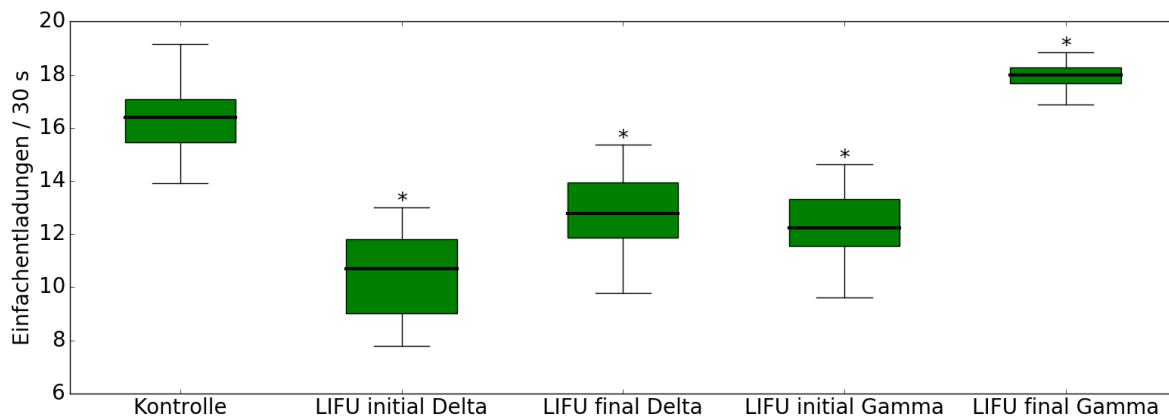


Abbildung 24: Zusammenfassende Darstellung der Einfachentladungen / 30 s. Es zeigt sich in allen ultraschallbehandelten Messgruppen eine signifikante Änderung im Vergleich zur Kontrollgruppe, wobei $p \leq 0,05$. Kontrolle $n = 13$, LIFU initial Delta $n = 10$, LIFU final Delta $n = 14$, LIFU initial Gamma $n = 13$, LIFU final Gamma $n = 25$. \top oberer Whisker; \perp unterer Whisker; — Median. Signifikanzen sind mit einem * gekennzeichnet.

In Abbildung 24 zeigt sich im Verlauf der Einfachentladungen eine deutliche Reduktion der spontanen Einzelentladungen in der Delta-Frequenzgruppe. Dies gilt sowohl für initial (2,5 min nach Messbeginn) als auch final (62,5 min nach Messbeginn) applizierten Ultra-

schall mit 800 kHz und einer Repetitionsrate im Delta-Frequenzbereich. Während in der Kontrollgruppe etwa 16 Einfachentladungen / 30 s zu beobachten sind, reduziert sich diese Zahl in der Gruppe LIFU final Delta im Median auf etwa 13 Einfachentladungen / 30 s und in der initialen Gruppe sogar auf etwa 11 Einfachentladungen / 30 s. Der U-Test nach Mann-Whitney zeigt sich mit $p \leq 0,05$ signifikant.

In der Gamma-Gruppe findet sich ebenfalls eine deutliche Reduktion der Einfachentladungen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Wie zuvor in Abbildung 23 gleicht auch hier die Darstellung LIFU initial Gamma weitestgehend der von LIFU final Delta und weist nur wenige Abweichungen auf (vgl. Abbildung 24). Im Median liegt die Verminderung der spontanen Einzelentladungen des Gamma-Frequenzbereichs bei etwa 4 Einzelentladungen / 30 s im Vergleich zur Kontrollgruppe, wobei der U-Test nach Mann-Whitney mit $p \leq 0,05$ signifikant ist. Die Änderung in der LIFU final Gamma Gruppe zeigt sich vor allem in einer Zunahme der Einfachentladungen / 30 s im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Änderung stellt sich im U-Test mit $p \leq 0,05$ ebenfalls signifikant dar und ist Gegenstand der späteren Diskussion.

Im Folgenden wurde nun die Anzahl der Mehrfachentladungen / 30 s analysiert. Wie in der unten gezeigten Abbildung 25 dargestellt, findet sich in allen Messprotokollen eine signifikante Reduktion dieser im Vergleich zur Kontrollgruppe, wobei $p \leq 0,05$ im U-Test nach Mann-Whitney.

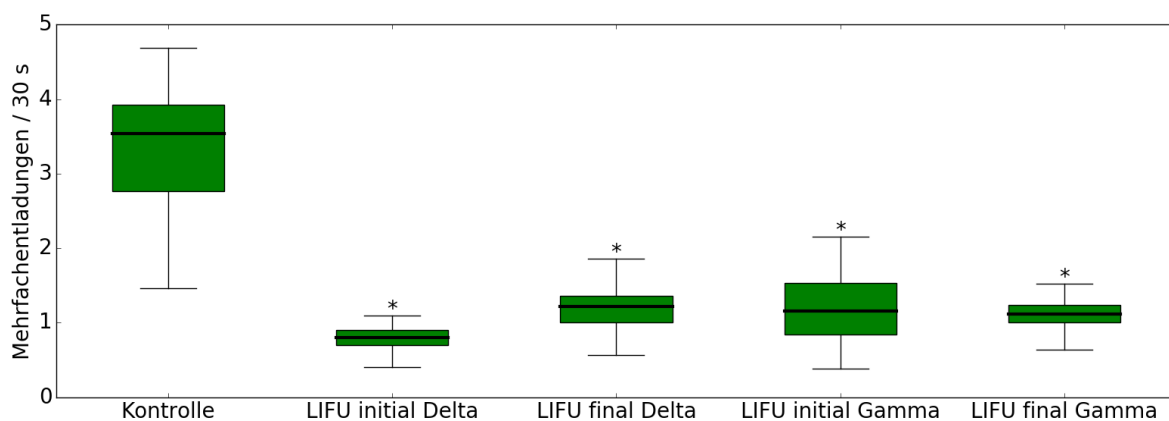


Abbildung 25: Graphische Darstellung der Mehrfachentladungen / 30 s. Es zeigt sich in allen ultraschallbehandelten Messgruppen eine signifikante Änderung im Vergleich zur Kontrollgruppe, wobei $p \leq 0,05$. Kontrolle $n = 13$, LIFU initial Delta $n = 10$, LIFU final Delta $n = 14$, LIFU initial Gamma $n = 13$, LIFU final Gamma $n = 25$. \top oberer Whisker; \perp unterer Whisker; — Median. Signifikanzen sind mit einem * gekennzeichnet.

Die Änderung ist besonders ausgeprägt in der Gruppe LIFU initial Delta, die mit 1 Mehrfachentladung / 30 s eine deutliche Verminderung im Vergleich zur Kontrollgruppe mit etwa 3,5 Mehrfachentladungen / 30 s aufweist. Die anderen Messgruppen zeigen im Median etwa 1,2 Mehrfachentladungen / 30 s. Auch dies ist im U-Test mit $p \leq 0,05$ signifikant.

5.1.2 Doppelpulsstimulation

Um eine Aussage über die Auswirkung von Ultraschallapplikation auf die synaptische Transmission zwischen den Schaffer-Kollateralen und den Pyramidenzellen treffen zu können, wurden mit Hilfe der Doppelpulsstimulation an insgesamt 21 Hirnschnitten sog. fEPSP (*field excitatory postsynaptic potential*) bestimmt, siehe Kapitel 4.2.4.

Anhand der entstehenden Messkurven wurde zunächst die Änderung des Doppelpulsverhältnisses (PPR, engl. für *paired-pulse ratio*) der jeweiligen Amplitude vor und nach Ultraschallbehandlung miteinander verglichen. Hierfür wurden zunächst die Daten der 1. Stimulation im Mittelwert auf 100 normiert. Die 2. Stimulation wurde hierzu im Verhältnis betrachtet. Eine übersichtliche Darstellung findet sich in der folgenden Abbildung 26.

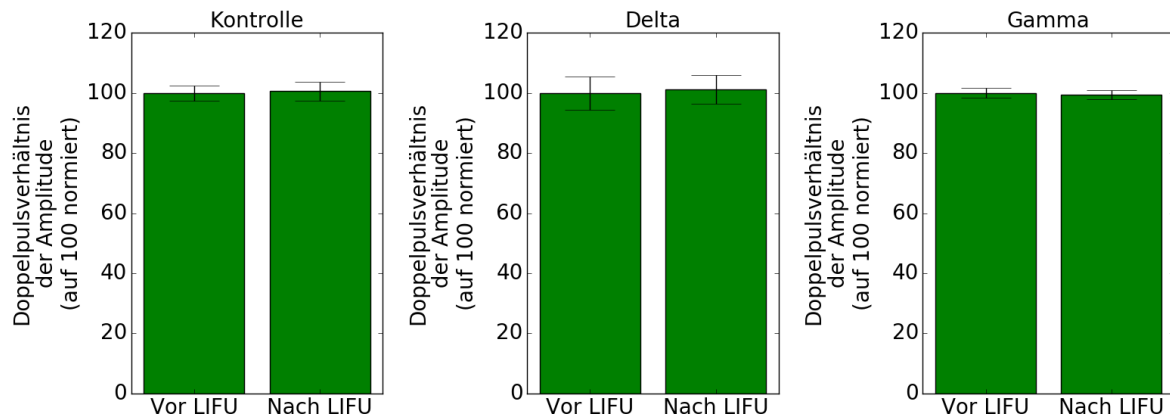


Abbildung 26: Darstellung des Doppelpulsverhältnis‘ der Amplitude vor und nach Ultraschallbehandlung. Vor LIFU bezeichnet hierbei die Gruppe an Gewebsschnitten vor einer Ultraschall-Applikation mit 800 kHz und einer Repetitionsrate im Delta- bzw. Gamma-Frequenzbereich. Diese Werte wurden in ihrem Mittelwert auf 100 normiert. Nach erfolgter Ultraschallbehandlung (vgl. Nach LIFU) wurden die entsprechenden Messwerte hierzu ins Verhältnis gesetzt. Kontrolle ($n = 9$), Delta ($n = 5$), Gamma ($n = 7$). Im Wilcoxon-Test zeigt sich keine signifikante Änderung des PPR in den jeweiligen Messprotokollen, wobei $p \leq 0,05$.

Wie aus Abbildung 26 ersichtlich ist, zeigt sich in den jeweiligen Messprotokollen kein signifikanter Unterschied vor zu nach LIFU. Dies wird auch im Wilcoxon-Test bestätigt. Hier ist mit $p = 0,25$ in der Kontrollgruppe, sowie $p = 0,25$ in der Deltamessung und $p = 0,60$ in der Gammamessung keine signifikante Änderung des PPR zu verzeichnen.

Um zu ermitteln, ob die synaptische Übertragung von der Stimulationsstärke abhängt, wurden im weiteren Verlauf die Messkurven eines Protokolls vor zu nach LIFU gemeinsam in einen Plot über die Stimulation aufgetragen (vgl. Abbildung 27).

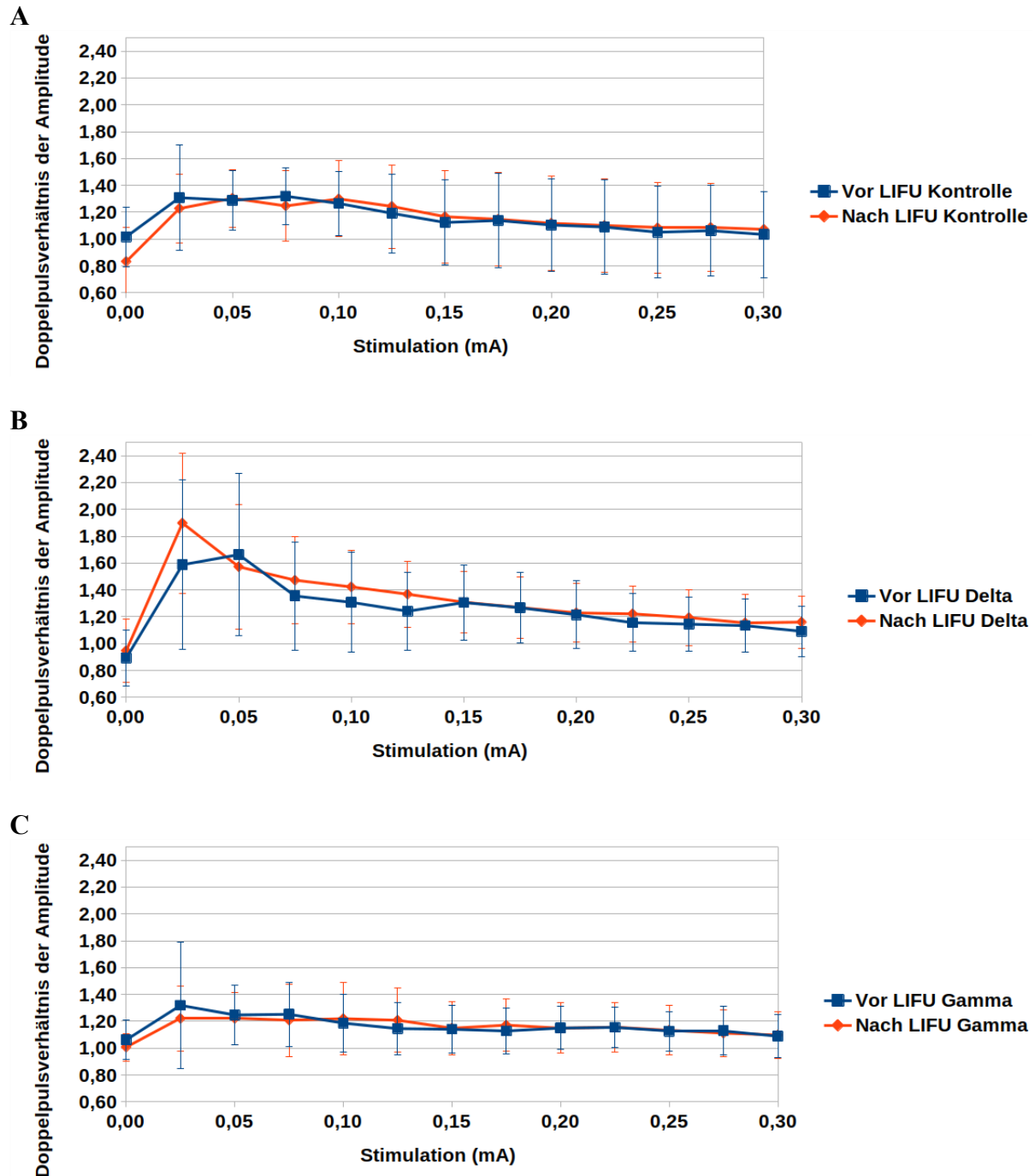


Abbildung 27: Darstellung des Doppelpulsverhältnis‘ der Amplitude über die Stimulationsstärke. Auch wenn sich das Doppelpulsverhältnis mit der Stimulationsstärke ändert, zeigt sich im Wilcoxon-Test kein signifikanter Unterschied nach Ultraschall-Applikation. **A** Kontrolle (n = 9), **B** Delta (n = 5), **C** Gamma (n = 7).

Auch hier zeigt sich keine signifikante Änderung des Kurvenverlaufs über die Stimulationsstärke in den entsprechenden Messprotokollen vor zu nach LIFU. In allen drei Protokollen liegt das Doppelpulsverhältnis der Amplitude zwischen etwa 0,8 und 1,9 und die

Änderungen innerhalb der Messungenauigkeit. Lediglich in der Delta-Messung ist zwischen einer Stimulationsstärke von 0 mA und 0,05 mA ein Ausschlag zu beobachten. Dieser besteht jedoch bereits vor LIFU und ist daher am ehesten auf Messchwankungen am lebenden Gewebe zurückzuführen (vgl. Abbildung 27).

Im weiteren Verlauf wurden die Steigungen der Kurven (engl. *slope*) zueinander in Bezug gesetzt (vgl. Abbildung 18). Auch hier wurde das Doppelpulsverhältnis der jeweiligen Stimulationen betrachtet. Eine Darstellung der entsprechend normierten Messergebnisse findet sich in der folgenden Abbildung 28.

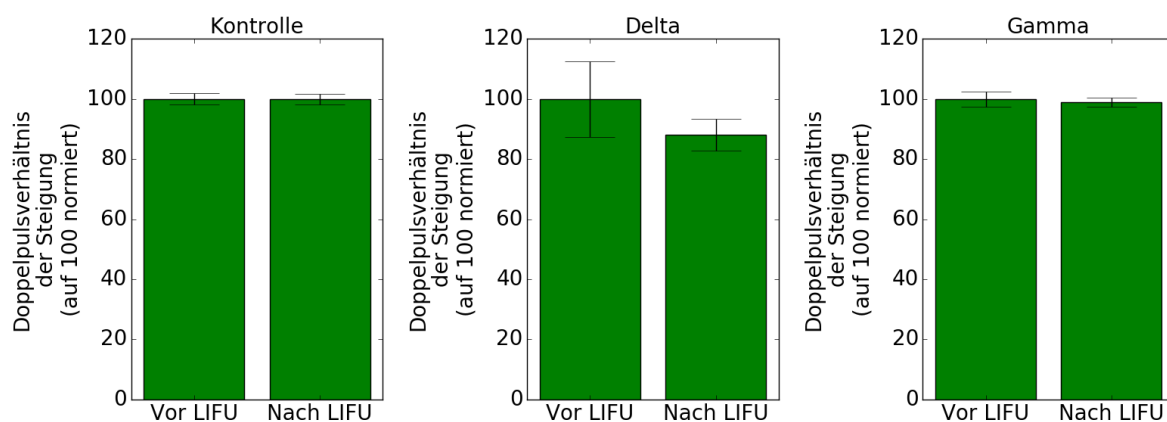


Abbildung 28: Darstellung des Doppelpulsverhältnis 'der Steigung vor und nach Ultraschallbehandlung. Vor LIFU bezeichnet hierbei die Gruppe an Gewebsschnitten vor einer Ultraschall-Applikation mit 800 kHz und einer Repetitionsrate im Delta- bzw. Gamma-Frequenzbereich. Diese Werte wurden in ihrem Mittelwert auf 100 normiert. Nach erfolgter Ultraschallbehandlung (vgl. nach LIFU) wurden die entsprechenden Messwerte hierzu ins Verhältnis gesetzt. Kontrolle ($n = 9$), Delta ($n = 5$), Gamma ($n = 7$). Im Wilcoxon-Test zeigt sich keine signifikante Änderung des PPR in den jeweiligen Messprotokollen, wobei $p \leq 0,05$.

Um ein verändertes Ansprechen auf eine bestimmte Stimulationsstärke sicher ausschließen zu können, wurden die Messdaten wie zuvor in der Bestimmung der Amplitude, vor zu nach LIFU über der Stimulationsstärke aufgetragen (vgl. Abbildung 29).

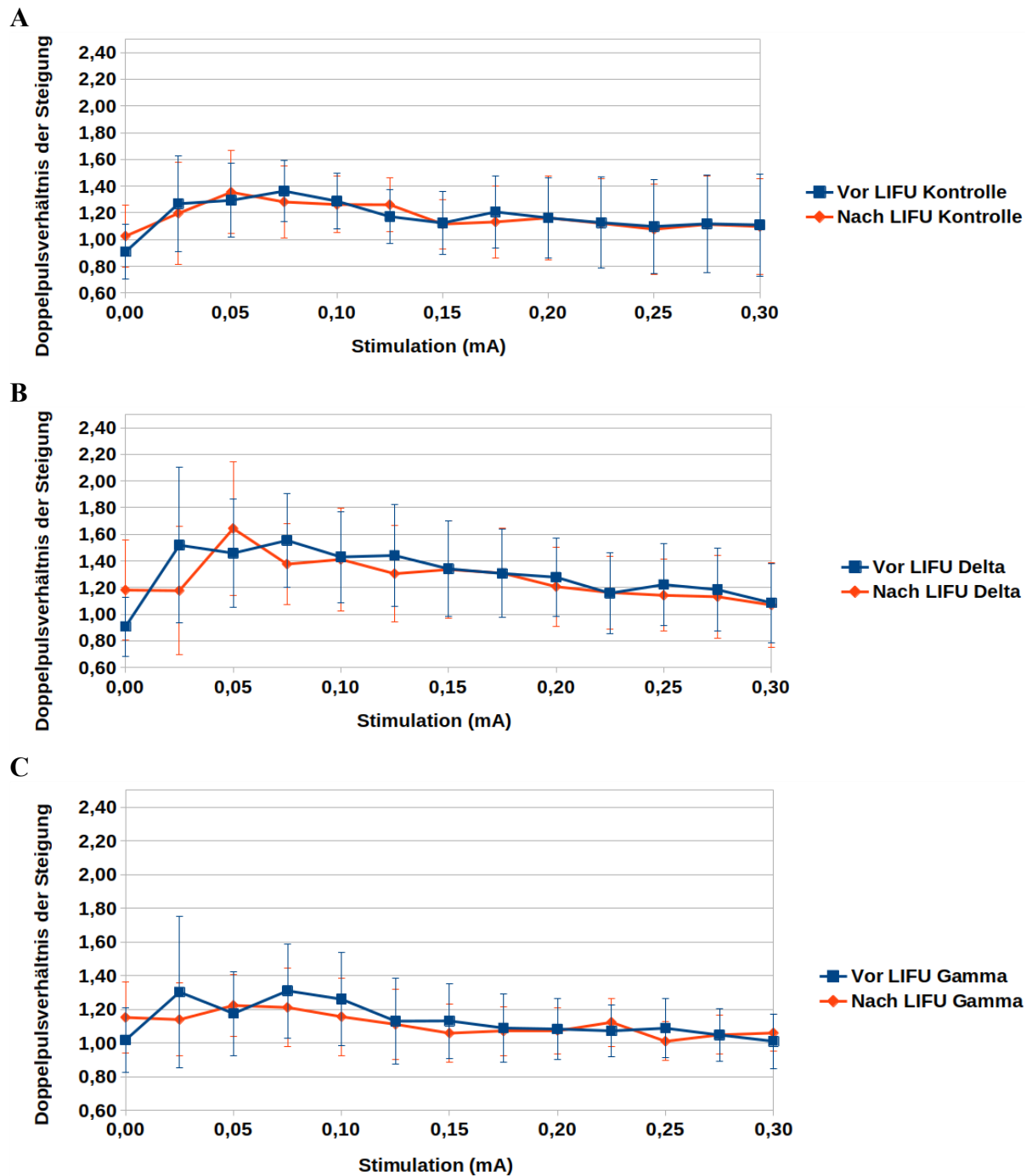


Abbildung 29: Darstellung des Doppelpulsverhältnis 'der Steigung' über die Stimulationsstärke. Es zeigen sich keine signifikanten Änderungen des Doppelpulsverhältnis 'in Abhängigkeit von der Stimulationsstärke. Dies wird auch im Wilcoxon-Test bestätigt, wobei $p \leq 0,05$. **A** Kontrolle ($n = 9$), **B** Delta ($n = 5$), **C** Gamma ($n = 7$).

Auch hier zeigt sich, wie zuvor bei der Darstellung der Amplitude (vgl. Abbildung 27), kein abweichender Kurvenverlauf der Steigung über die Stimulationsstärke vor zu nach LIFU. Die

gemittelten Daten schwanken in den entsprechenden Verläufen zwischen 0,8 und 1,6. Die Abweichungen liegen innerhalb der jeweiligen Fehlerbalken. Es zeigt sich somit keine signifikante Änderung nach Ultraschallapplikation (vgl. Abbildung 29).

5.2 Intrazelluläre Ableitung

Insgesamt wurden 22 Zellen im Stratum pyramidale der CA1-Region zur Bestimmung der passiven und aktiven Membraneigenschaften untersucht. Die genaue Aufteilung der Messungen auf die verschiedenen Versuchsprotokolle findet sich in Tabelle 11.

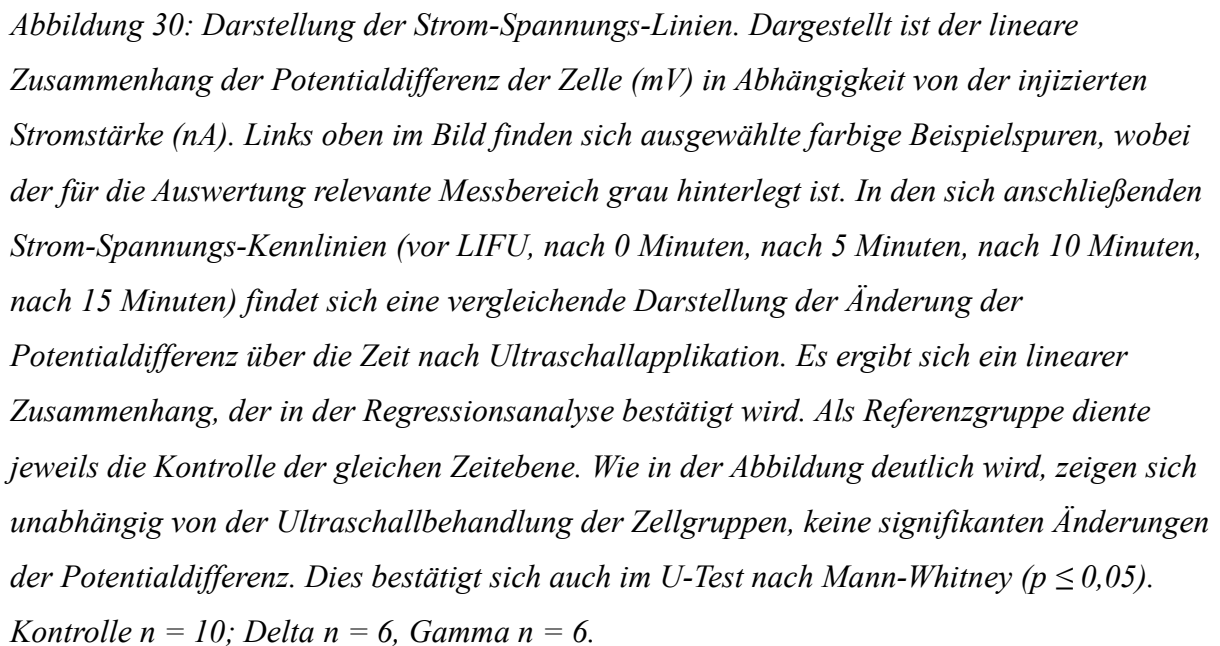
5.2.1 Passive Membraneigenschaften

Die Injektion eines negativen Stroms bewirkt eine Hyperpolarisation der Zellmembran. Demgegenüber hat eine positive Strominjektion eine Depolarisation zur Folge. Wird hierbei das sog. Schwellenpotential überschritten, werden Aktionspotentiale evoziert, die sich je nach Dauer der Strominjektion als einzelne Entladungen oder als Salve mehrerer hintereinander ausgelöster Aktionspotentiale darstellen (engl.: *burst*).

In den folgenden Abbildungen findet sich eine Darstellung dieser zellulären Veränderungen in Abhängigkeit von der Strominjektion sowie der Ultraschallbehandlung mit 800 kHz verschiedener Repetitionsmuster. In der Annahme, dass alle Zellen einer zeitlichen Veränderung unterliegen, wurden die Daten der jeweiligen Untersuchungsgruppen vor sowie 0 min, 5 min, 10 min und 15 min nach LIFU gemittelt und zunächst mit der Kontrollgruppe verglichen. Da sich die einzelnen Zellen in ihren zu Grunde liegenden zellulären Eigenschaften dennoch leicht unterscheiden konnten, wurden die einzelnen Zellpopulationen eines Messprotokolls im weiteren Verlauf auch intern analysiert.

5.2.1.1 Eingangswiderstand

Zunächst wurde die Potentialdifferenz in Abhängigkeit der Stimulation für eine Hyperpolarisation untersucht, woraus sich der Eingangswiderstand ableiten lässt. Wie in der folgenden Abbildung 30 durch die Strom-Spannungs-Kennlinien (I-V-Kurve) dargestellt, wurde zunächst der lineare Zusammenhang zwischen negativer Strominjektion und der passiven Spannungsantwort untersucht, die ein Maß für die Hyperpolarisation der Zellmembran ist.



Wie in Abbildung 30 verdeutlicht, besteht der lineare Zusammenhang der Abhängigkeit der Potentialdifferenz von der Strominjektion auch nach Ultraschallapplikation. Das Bestimmtheitsmaß der hierzu durchgeführten linearen Regression liegt sowohl vor als auch nach Ultraschallapplikation im Bereich von 0,99 - 1,00 und ist in der folgenden Tabelle 13 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 13: R^2 der Strom-Spannungs-Linien

	Kontrolle	Delta	Gamma
Vor LIFU	0,997	0,997	0,997
nach 0 Minuten	0,998	0,999	0,996
nach 5 Minuten	0,999	0,999	0,999
nach 10 Minuten	1,000	0,999	1,000
nach 15 Minuten	0,999	0,999	0,994

Die gemäß der Gleichung $m \cdot x + c$ ermittelte Steigung "m" der Strom-Spannungs-Kurven entspricht dem Eingangswiderstand der jeweiligen Zellen. Er bildete die Grundlage der im Folgenden durchgeführten Vergleiche und ist in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14: Eingangswiderstand ($M\Omega$) der untersuchten Zellpopulationen

	Kontrolle	Delta	Gamma
Vor LIFU	35,237	35,071	34,287
nach 0 Minuten	34,443	32,226	33,075
nach 5 Minuten	33,608	31,757	33,371
nach 10 Minuten	33,104	31,039	34,888
nach 15 Minuten	32,409	32,851	37,277

Die ermittelten Werte des Eingangswiderstands ($M\Omega$) liegen in allen Messprotokollen im Mittel zwischen 30 $M\Omega$ – 38 $M\Omega$. Wie in der folgenden Abbildung 33 mit Hilfe vergleichender Balkendiagramme dargestellt, ergibt sich kein signifikanter Unterschied der verschiedenen Stimulationsgruppen (Delta und Gamma) im Vergleich zur Kontrollgruppe einer Zeitebene (0 min nach LIFU, 5 min nach LIFU, 10 min nach LIFU und 15 min nach LIFU).

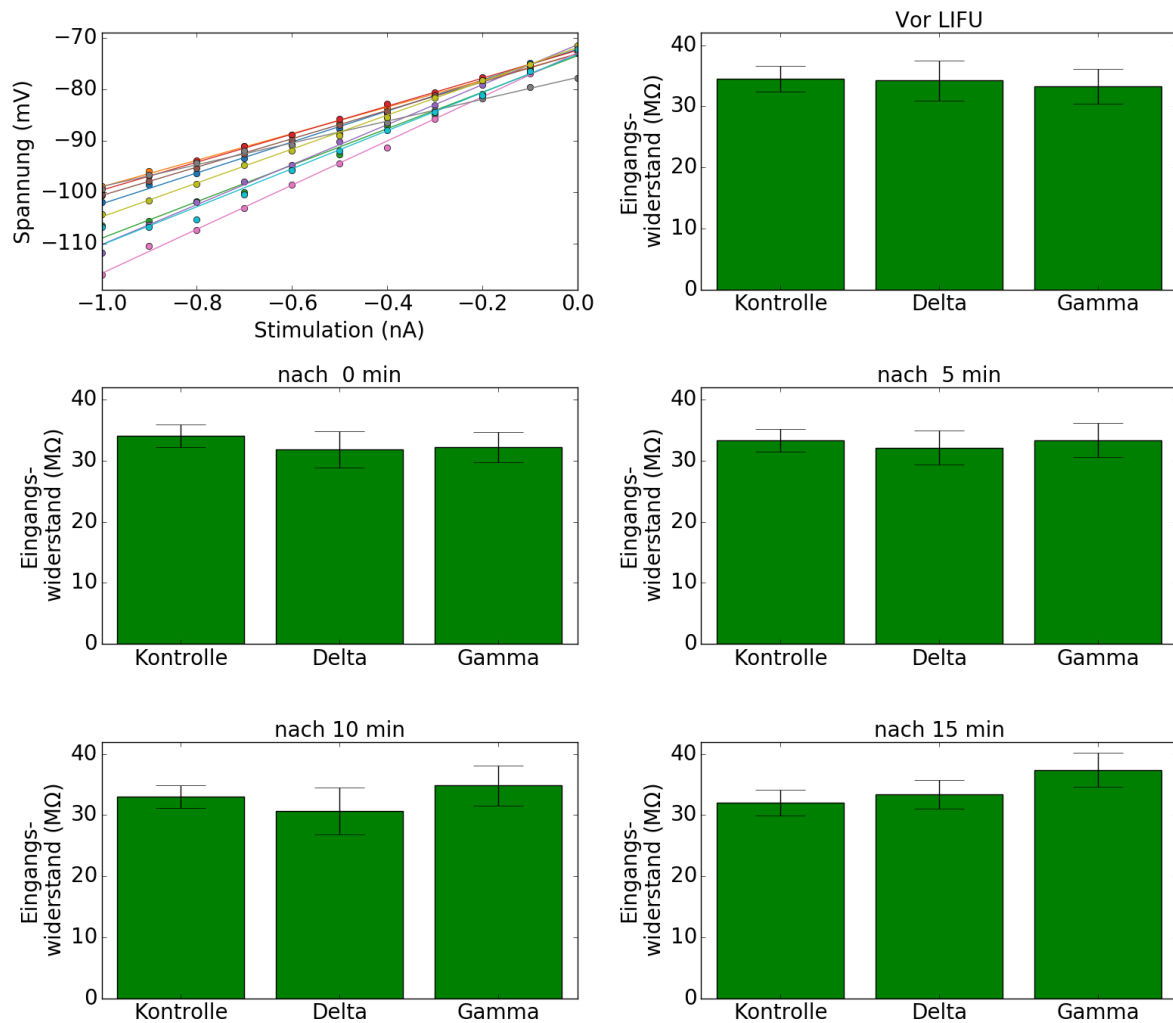


Abbildung 31: Darstellung des Eingangswiderstands in $M\Omega$. Links oben im Bild finden sich repräsentativ ausgewählte farbige Strom-Spannungs-Kennlinien und die zugehörigen Geraden der linearen Regression. In den sich anschließenden Balkendiagrammen (vor LIFU, nach 0 Minuten, nach 5 Minuten, nach 10 Minuten, nach 15 Minuten) findet sich eine vergleichende Darstellung der Änderung des Eingangswiderstands über die Zeit nach Ultraschallapplikation. Als Referenzgruppe diente jeweils die Kontrolle der gleichen Zeitebene. Wie in der Abbildung deutlich wird, zeigen sich keine signifikanten Änderungen 0 min nach LIFU, 5 min nach LIFU, 10 min nach LIFU und 15 min nach LIFU in der Delta- bzw. Gamma-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Kontrolle $n = 10$; Delta $n = 6$, Gamma $n = 6$.

Wie in Abbildung 31 und Tabelle 14 dargestellt, ändert sich der Eingangswiderstand der Zellen durch LIFU-Applikation nicht signifikant. In der Gamma-Gruppe ist besonders gegen Ende der Messung (15 min nach LIFU) eine Veränderung des Eingangswiderstandes zu beobachten. Dieser steigt von im Mittel 34 $M\Omega$ vor LIFU auf 37 $M\Omega$ 15 min nach LIFU an.

Diese Variabilität ist im U-Test nach Mann-Whitney allerdings nicht signifikant. Auch in den anderen Messgruppen ergeben sich im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe im U-Test keine signifikanten Änderungen über die Zeit, wobei $p \leq 0,05$ (vgl. Tabelle 15).

Tabelle 15: p-Werte des Mann-Whitney-Tests des Eingangswiderstands im Vergleich zur Kontrollgruppe

	Delta	Gamma
Vor LIFU	0,24	0,23
nach 0 Minuten	0,12	0,17
nach 5 Minuten	0,14	0,41
nach 10 Minuten	0,20	0,38
nach 15 Minuten	0,28	0,24

Um eine Aussage darüber treffen zu können, in wie weit sich die einzelnen Zellen einer Stimulationsgruppe über die Zeit nach LIFU verändern, wurde im weiteren Verlauf das Verhalten der einzelnen Zellgruppen untersucht. Eine entsprechende Darstellung findet sich in der folgenden Abbildung 32. Hierbei dienten die ermittelten Daten vor LIFU als Referenz, um die ermittelten Werte 0 min, 5 Min, 10 min und 15 min nach LIFU vergleichen zu können.

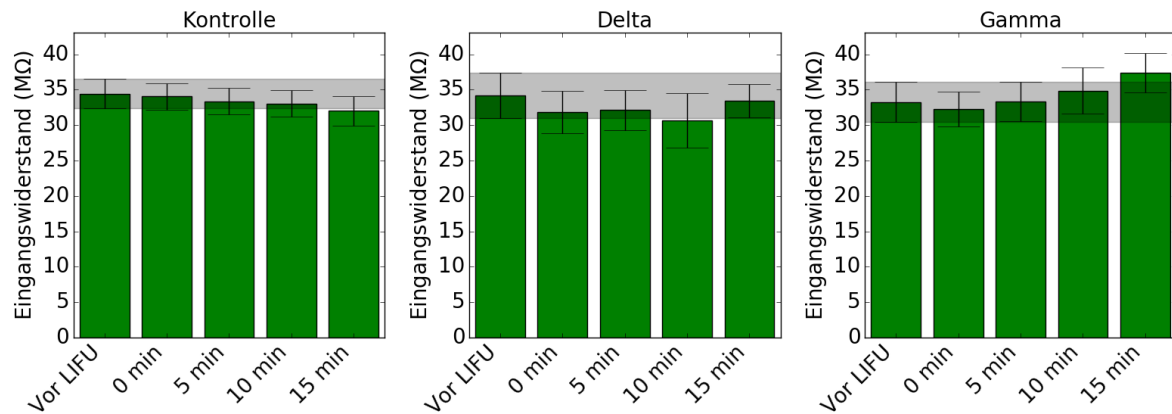


Abbildung 32: Darstellung des Eingangswiderstands ($M\Omega$) über die Zeit. Von links nach rechts: Kontrolle, Delta, Gamma. Als Referenzgruppe diente die jeweilige Zellpopulation eines Messprotokolls vor LIFU. Wie in der Abbildung gezeigt, ergeben sich auch innerhalb der jeweiligen Stimulationsprotokolle (Kontrolle, Delta, Gamma) im Wilcoxon-Test keine signifikanten Änderungen des Eingangswiderstands ($M\Omega$) im Vergleich zu der Zellpopulation vor LIFU. Wie durch die grau eingezeichnete Linie in der Abbildung verdeutlicht, liegen sämtliche Änderungen des Eingangswiderstands ($M\Omega$) innerhalb des Fehlerbalkens von vor LIFU. Kontrolle $n = 10$; Delta $n = 6$, Gamma $n = 6$.

Wie in der Abbildung 32 verdeutlicht, ergaben sich auch innerhalb der verschiedenen Stimulationsprotokolle keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Messdaten vor LIFU. Dies zeigt sich auch im Wilcoxon-Test, dessen p-Werte in der folgenden Tabelle 16 aufgeführt sind.

Tabelle 16: Darstellung der p-Werte des Wilcoxon-Tests für den Eingangswiderstand im Vergleich zur selben Stimulationsgruppe vor LIFU

	nach 0 min	nach 5 min	nach 10 min	nach 15 min
Kontrolle	0,38	0,56	0,43	0,11
Delta	0,31	0,56	0,31	0,69
Gamma	0,16	1,00	0,56	0,16

5.2.1.2 Membranzeitkonstante

Die Bestimmung der Membranzeitkonstante τ gibt Aufschluss über die Zeit, die vergeht, bis die Membranspannung auf 63% ihres Endwertes angestiegen ist bzw. bis sich das Membranpotential auf $1/e = 37\%$ dem Endwert genähert hat [20]. Wie zuvor in der Darstellung des Eingangswiderstands bereits beschrieben, wurden auch hier die Messdaten vor LIFU sowie 0 min, 5 min, 10 min und 15 min nach LIFU des jeweiligen Messprotokolls zunächst mit der Kontrollgruppe derselben Zeitebene verglichen. Eine übersichtliche Darstellung der Daten findet sich in der folgenden Abbildung 33.

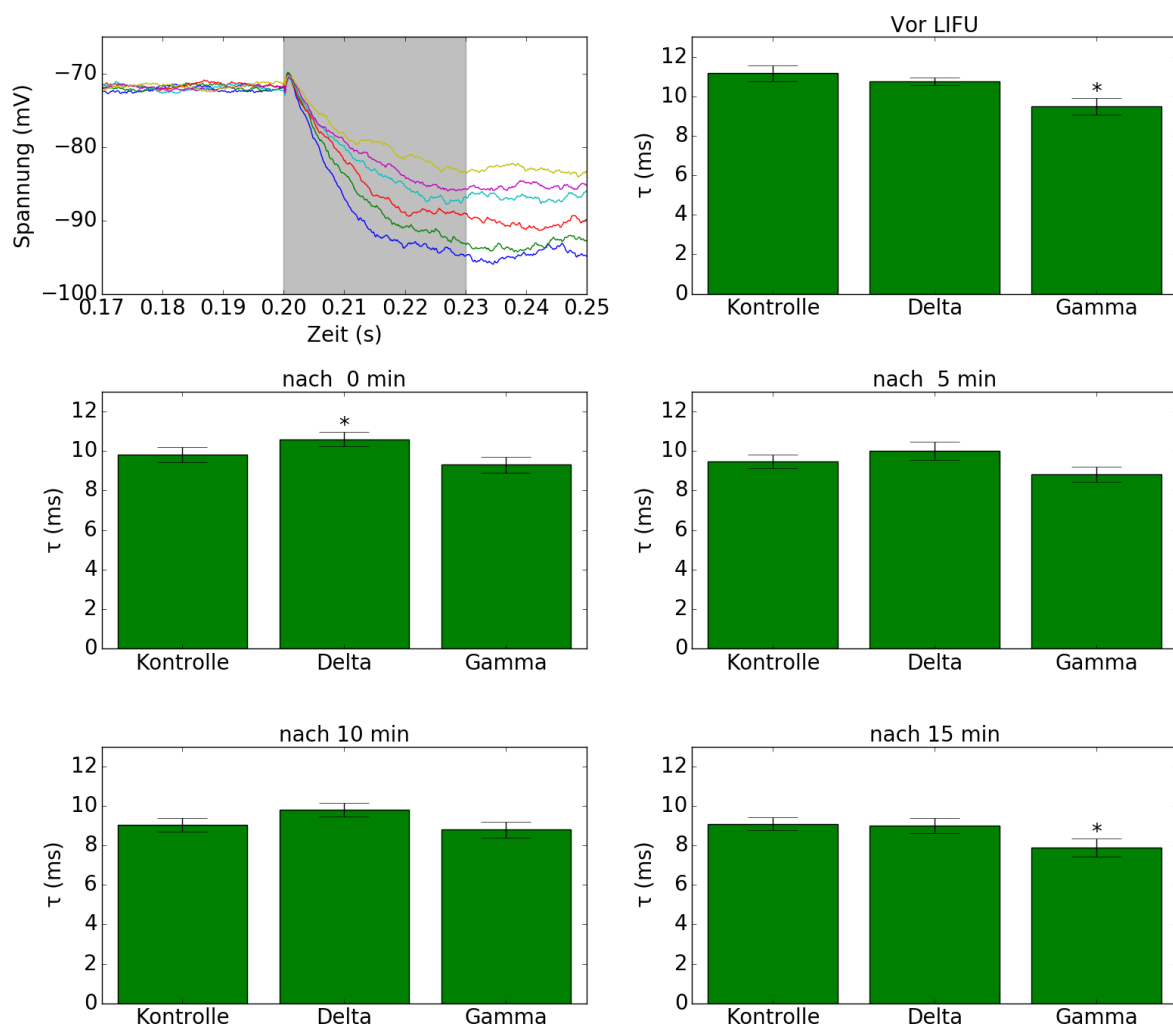


Abbildung 33: Darstellung der Zeitkonstante τ über die Zeit. Links oben im Bild finden sich repräsentativ ausgewählte farbige Beispielspuren für verschiedene Stimulationsströme, wobei der für die Auswertung relevante Messbereich grau hinterlegt ist. In den sich anschließenden Balkendiagrammen (vor LIFU, nach 0 Minuten, nach 5 Minuten, nach 10 Minuten, nach 15 Minuten) findet sich eine Darstellung der Änderung der Zeitkonstante τ über die Zeit nach

*Ultraschallapplikation. Als Referenzgruppe diente jeweils die Kontrolle der gleichen Zeitebene. Wie in der Abbildung deutlich wird, bestehen bereits vor LIFU im U-Test nach Mann-Whitney signifikante Schwankungen innerhalb der Gruppen. Kontrolle $n = 10$; Delta $n = 6$, Gamma $n = 6$. Signifikanzen ($p \leq 0,05$) sind mit einem * gekennzeichnet.*

Wie in der Abbildung 33 dargestellt, zeigen sich zu den verschiedenen Zeitpunkten (0 min, 5 min, 10 min und 15 min nach LIFU) keine signifikanten Änderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Vielmehr unterliegen die Messdaten starken Schwankungen, die keine klaren Strukturen erkennen lassen. Dies wird auch durch den U-Test nach Mann-Whitney verdeutlicht, dessen Werte im Folgenden tabellarisch dargestellt sind.

Tabelle 17: Darstellung der p-Werte des U-Tests nach Mann-Whitney für die Zeitkonstante τ im Vergleich zur Kontrollgruppe

	Delta	Gamma
Vor LIFU	0,39	0,03
nach 0 Minuten	0,05	0,32
nach 5 Minuten	0,13	0,06
nach 10 Minuten	0,07	0,19
nach 15 Minuten	0,46	0,00

Wie in Tabelle 17 dargestellt, zeigen die verschiedenen Gruppen immer wieder ein signifikant unterschiedliches Verhalten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies wird auch im Delta-Protokoll deutlich, wobei sich die Messdaten 0 min nach LIFU im U-Test signifikant von der Kontrollgruppe unterscheiden (vgl. auch Abbildung 33). Das Balkendiagramm der Gamma-Messdaten zeigt ebenfalls starke Abweichungen im Vergleich zur Kontrollgruppe, wobei bereits vor LIFU signifikante Unterschiede bezüglich der Zeitkonstante τ im Vergleich zur Kontrollgruppe bestehen (vgl. Abbildung 33).

Im weiteren Verlauf wurde nun das Verhalten der einzelnen Zellpopulationen selbst untersucht, um eine Aussage darüber treffen zu können, wie sich die einzelnen Zellgruppen über die Zeit verhalten. Hierzu wurde die Zellpopulation vor Ultraschallbehandlung als Kontrollgruppe festgelegt, um das Verhalten derselben Zellen über die Zeit nach 0 min, nach 5 min, nach 10 min und nach 15 min analysieren zu können.

Eine übersichtliche Darstellung findet sich in der folgenden Abbildung 34.

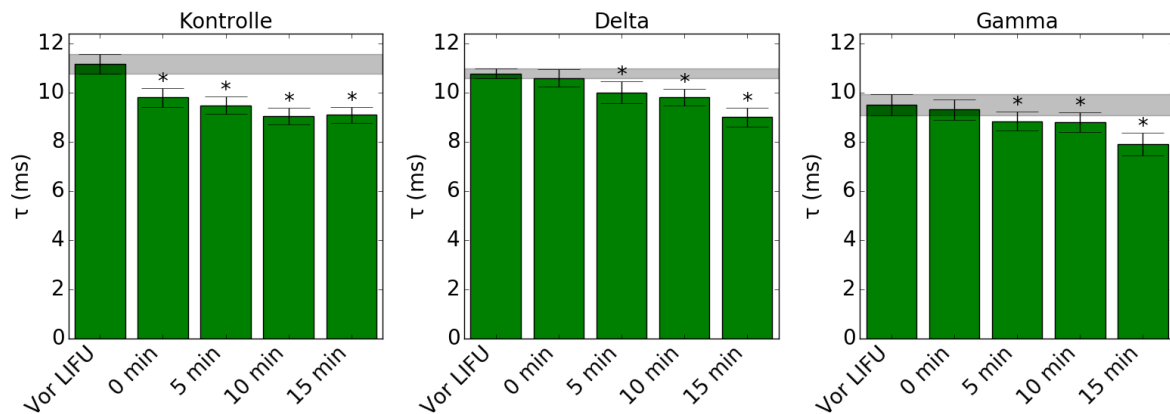


Abbildung 34: Darstellung der Zeitkonstante τ (ms) über die Zeit. Von links nach rechts: Kontrolle, Delta, Gamma. Als Referenzgruppe diente die jeweilige Zellpopulation eines Messprotokolls vor LIFU. Wie in der Abbildung gezeigt ergeben sich innerhalb der verschiedenen Stimulationsgruppen signifikante Unterschiede im Wilcoxon-Test bezüglich der Zeitkonstante τ über die Zeit. Diese sind in der obigen Abbildung mit einem * gekennzeichnet und liegen außerhalb des grau eingezeichneten Fehlerbalkens der Daten vor LIFU. Kontrolle $n = 10$; Delta $n = 6$, Gamma $n = 6$. Signifikanzen ($p \leq 0,05$) sind mit einem * gekennzeichnet.

Wie in der Abbildung 34 dargestellt, zeigt sich eine signifikante Abnahme der Zeitkonstante τ über die Zeit innerhalb der verschiedenen Messgruppen. Dies bestätigt sich auch im Wilcoxon-Test, dessen Werte in der folgenden Tabelle 18 angegeben sind.

Tabelle 18: Darstellung der p -Werte des Wilcoxon-Tests für die Zeitkonstante im Vergleich zur selben Stimulationsgruppe vor LIFU

	nach 0 min	nach 5 min	nach 10 min	nach 15 min
Kontrolle	0,00	0,00	0,00	0,00
Delta	0,20	0,02	0,00	0,00
Gamma	0,59	0,00	0,00	0,00

Im Bereich der Kontrollgruppe fällt die Zeitkonstante bereits 0 min nach LIFU von etwa 11 ms auf 10 ms ab, um im Verlauf der Messung 15 min nach LIFU bei etwa 9 ms zu liegen. Diese Änderung der Membranzeitkonstante zeigt sich in den anderen Messprotokollen der

Delta- und Gamma-Gruppe weniger ausgeprägt. Hier ist im Vergleich zu vor LIFU eine signifikante Änderung der Membranzeitkonstante erst 5 min nach LIFU nachzuweisen. Auch in diesen Messprotokollen fallen die angegebenen Werte bis 15 min nach LIFU jedoch auf etwa 9 ms ab.

5.2.1.3 Nachhyperpolarisation

Einige Zellen wiesen nach abgelaufener Depolarisation ein negativeres Membranpotential auf als vor der Erregung. Dieses Phänomen bezeichnet man als Nachhyperpolarisation (AHP, engl.: *after hyperpolarisation potential*) (vgl. Abbildung 15). Es basiert auf einer zusätzlichen Kaliumleitfähigkeit, die sich im Anschluss an ein abgelaufenes Aktionspotential einstellt. Träger dieses Ionenstroms sind calciumaktivierte Kaliumkanäle (SK- und BK-Kanäle). Während eines Aktionspotentials strömen Calciumionen in das Innere der Zelle und aktivieren diese bis die intrazelluläre Kaliumkonzentration unter 100 nM gesunken ist. Nach Schließung der Kanäle nähert sich das Membranpotential wieder den Werten, die vor dem Aktionspotential beobachtet werden konnten (vgl. [20] S. 68).

Abbildung 35 verdeutlicht den Einfluss von Ultraschallapplikation auf die Nachhyperpolarisation der jeweiligen Zellen.

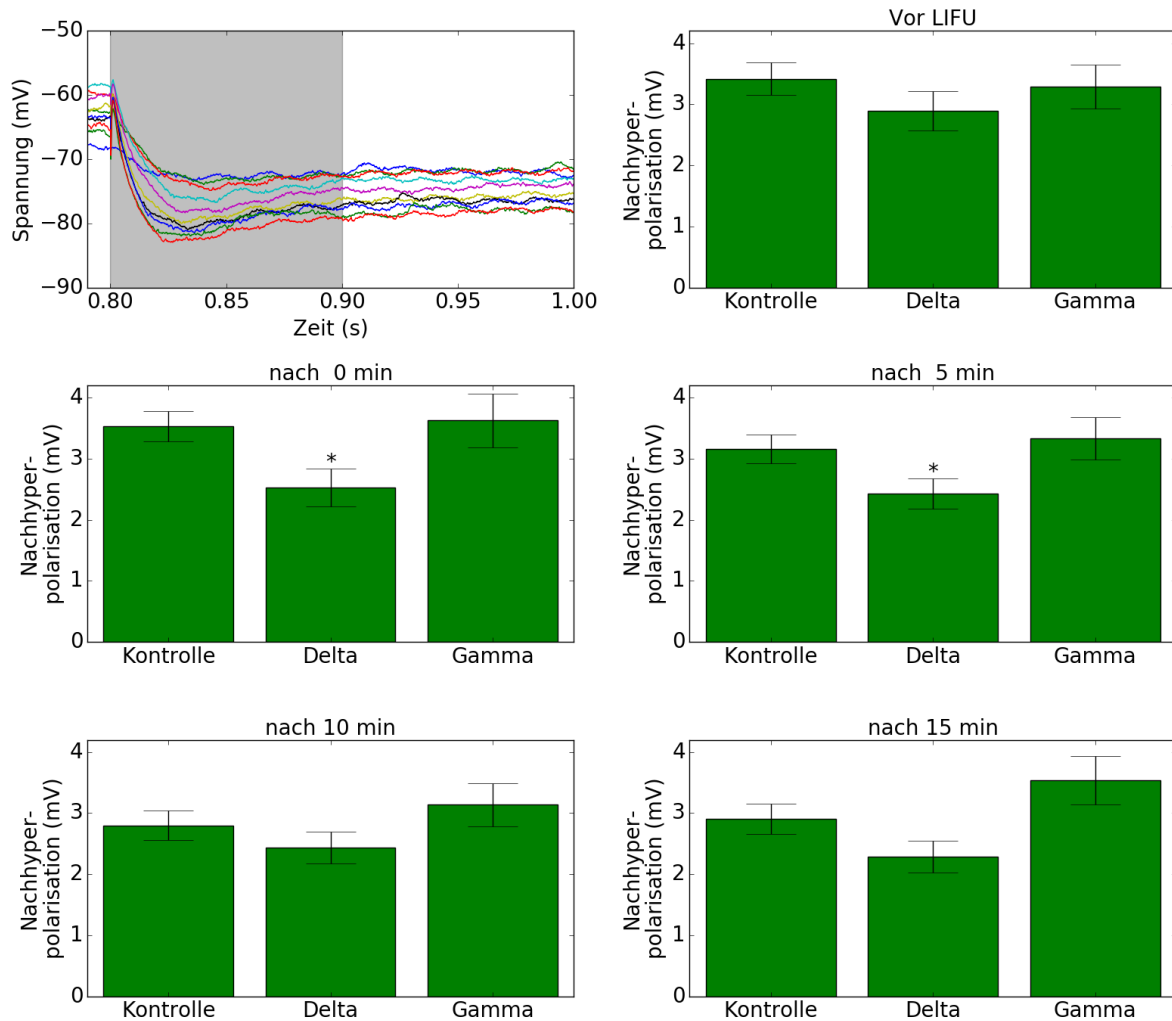


Abbildung 35: Darstellung des Betrages der Nachhyperpolarisation (mV). Links oben im Bild finden sich ausgewählte farbige Beispielspuren, wobei der für die Auswertung relevante Messbereich grau hinterlegt ist. In den sich anschließenden Grafiken (vor LIFU, nach 0 Minuten, nach 5 Minuten, nach 10 Minuten, nach 15 Minuten) findet sich eine Darstellung der Änderung der Nachhyperpolarisation über die Zeit nach Ultraschallapplikation. Als Referenzgruppe diente jeweils die Kontrolle der gleichen Zeitebene. Signifikante Änderungen ergaben sich hierbei nur für das Delta-Protokoll nach 0 resp. 5 Minuten. Kontrolle $n = 10$; Delta $n = 6$, Gamma $n = 6$. Signifikanzen ($p \leq 0,05$) sind mit einem * gekennzeichnet.

Wie in der Abbildung 35 dargestellt, ergeben sich besonders im Bereich der Deltastimulation signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese sind, wie in der oben aufgeführten Abbildung dargestellt, 0 min und 5 min nach LIFU nachzuweisen. Ab 10 min nach LIFU bestehen keine signifikanten Unterschiede mehr zur Kontrollgruppe. Auch der U-

Test nach Mann-Whitney zeigt sich unauffällig. Seine Werte sind im Folgenden in Tabelle 19 aufgeführt.

Tabelle 19: Darstellung der p-Werte des U-Test nach Mann-Whitney für die Nachhyperpolarisation (mV) im Vergleich zur Kontrollgruppe

	Delta	Gamma
Vor LIFU	0,09	0,31
nach 0 Minuten	0,00	0,12
nach 5 Minuten	0,03	0,45
nach 10 Minuten	0,27	0,33
nach 15 Minuten	0,12	0,12

Da sich bereits vor LIFU Unterschiede im Bereich der Nachhyperpolarisation ergaben (vgl. Abbildung 35), die sich im U-Test nach Mann-Whitney allerdings nicht signifikant darstellten, wurde im weiteren Verlauf das Verhalten der einzelnen Zellpopulationen selbst untersucht, um eine Aussage darüber treffen zu können, wie sich die einzelnen Zellgruppen über die Zeit verhalten. Hierzu wurde die Zellpopulation vor Ultraschallbehandlung als Kontrollgruppe festgelegt, um das Verhalten derselben Zellen über die Zeit in den darauffolgenden Messungen nach 0 min, nach 5 min, nach 10 min und nach 15 min analysieren zu können. Eine zusammenfassende Darstellung findet sich in der folgenden Abbildung 36.

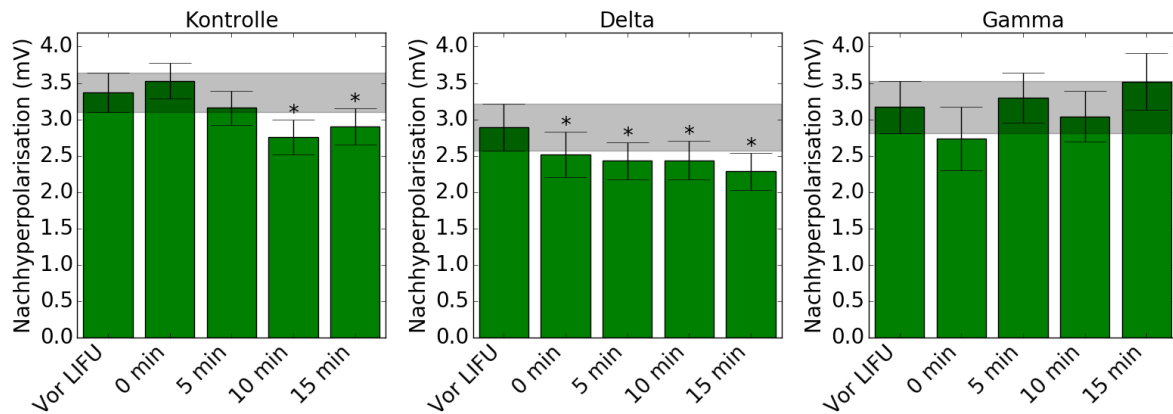


Abbildung 36: Darstellung der Nachhyperpolarisation (mV) über die Zeit. Von links nach rechts: Kontrolle, Delta, Gamma. Als Referenzgruppe diente die jeweilige Zellpopulation eines Messprotokolls vor LIFU. Wie in der Abbildung deutlich wird, zeigen sowohl die Zellen der Kontrollgruppe, als auch des Delta- und Gamma-Protokolls deutliche Schwankungen ihrer Nachhyperpolarisation (mV). Diese stellen sich in den beiden zuerst genannten Protokollen im Wilcoxon-Test zum Teil auch signifikant dar, wobei ihr Wertebereich dabei auch bisweilen innerhalb des grau eingezeichneten Fehlerbalkens der entsprechenden Daten vor LIFU liegt. Kontrolle $n = 10$; Delta $n = 6$, Gamma $n = 6$. Signifikanzen sind mit einem * gekennzeichnet.

Wie in Abbildung 36 dargestellt zeigt sich auch innerhalb der jeweiligen Stimulationsprotokolle eine Änderung der Nachhyperpolarisation über die Zeit, die sich für die Kontrolle und die Delta-Gruppe im Wilcoxon-Test signifikant darstellt (vgl. Tabelle 20).

Tabelle 20: Darstellung der p-Werte des Wilcoxon-Tests für die Nachhyperpolarisation (mV) im Vergleich zur selben Stimulationsgruppe vor LIFU

	nach 0 min	nach 5 min	nach 10 min	nach 15 min
Kontrolle	0,19	0,07	0,00	0,00
Delta	0,00	0,00	0,00	0,00
Gamma	0,13	0,12	0,56	0,20

Die Zellen des Gamma-Protokolls zeigen bezüglich ihrer Schwankungen keine klare Tendenz. Änderungen liegen innerhalb des angegebenen Fehlerbalkens und zeigen auch im Wilcoxon-Test keine Signifikanz, wobei $p \leq 0,05$. Demgegenüber stehen die Daten der Delta-Gruppe und der Kontrolle. In beiden Gruppen zeigt sich eine deutliche Verminderung der Nachhyperpolarisation über die Zeit, wobei sie in der Kontrollgruppe nach 15 min im Betrag bei etwa 3 mV liegt und im Bereich der Delta-Messung bei etwa 2,3 mV. Obgleich der Wilcoxon-Test auf signifikante Änderungen hinweist, liegen die Werte doch weiterhin innerhalb der Fehlergrenzen.

5.2.1.4 Spannungseinbruch

Die Zellmembran einiger Zellen wird bei maximaler Hyperpolarisation wieder depolarisiert (vgl. Abbildung 14). Diese Depolarisation beruht auf einem kationischen Einwärtsstrom. Die Kanäle (HCN, engl.: *hyperpolarization cyclic nucleotide-gated nonspecific*), die diesen Einwärtsstrom tragen, werden durch Hyperpolarisation sowie zyklische Nukleotide aktiviert [93].

Die Amplitude des Spannungseinbruchs ist abhängig vom Ausmaß der Hyperpolarisation und zeigt eine deutliche Abflachung, je mehr sich diese dem Wert 0 nähert.

Untersucht wurde der Einfluss von Ultraschallapplikation auf den Spannungseinbruch über die Zeit. Eine graphische Darstellung der ermittelten Daten findet sich in der folgenden Abbildung 37.

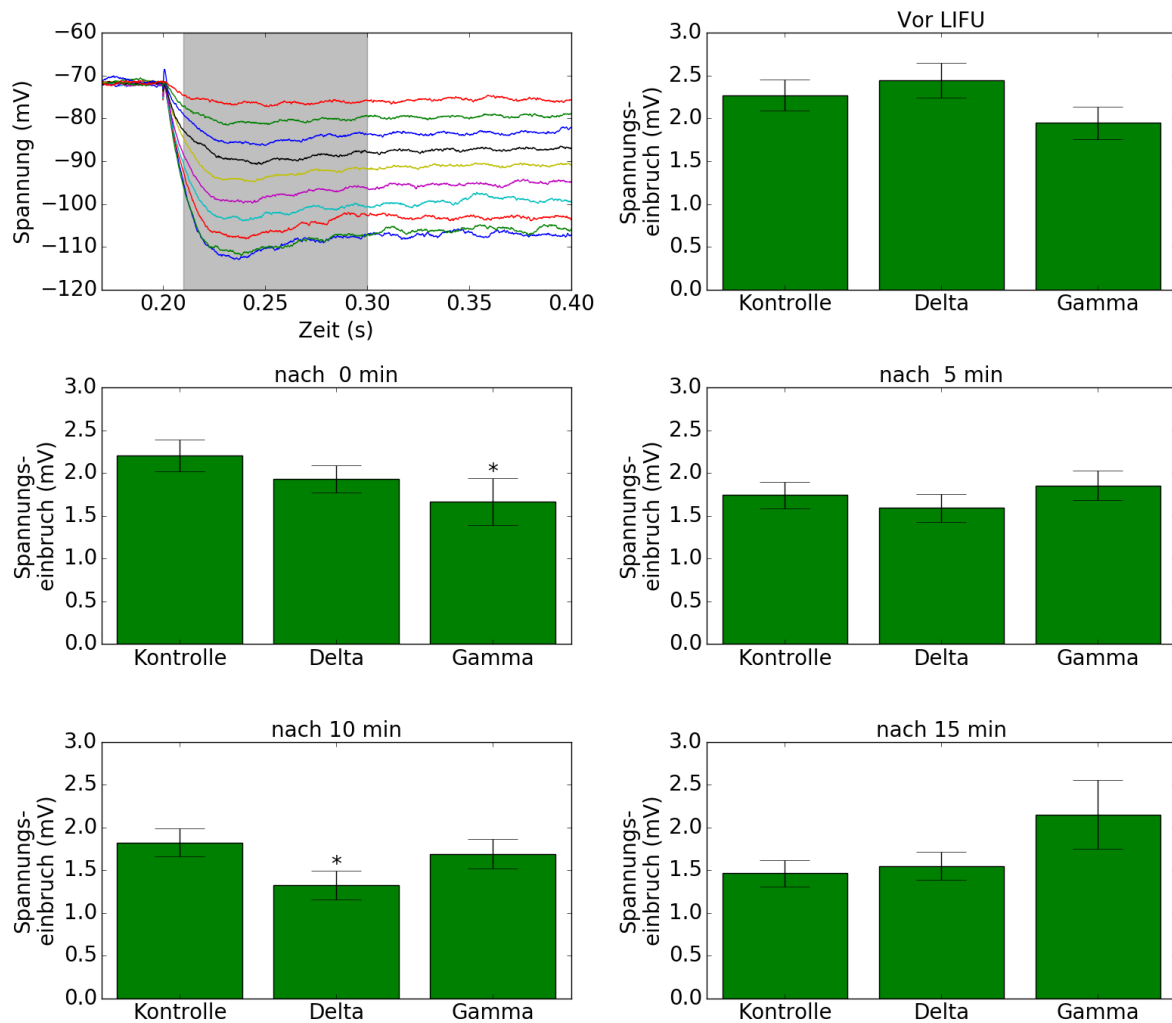


Abbildung 37: Darstellung des Spannungseinbruchs (mV) über die Zeit. Links oben im Bild finden sich ausgewählte farbige Beispielspuren, wobei der für die Auswertung relevante Messbereich grau hinterlegt ist. In den sich anschließenden Grafiken (vor LIFU, nach 0 Minuten, nach 5 Minuten, nach 10 Minuten, nach 15 Minuten) findet sich eine Darstellung der Änderung des Spannungseinbruchs über die Zeit nach Ultraschallapplikation. Als Referenzgruppe diente jeweils die Kontrolle der gleichen Zeitebene. Kontrolle $n = 10$; Delta $n = 6$, Gamma $n = 6$. Signifikanzen ($p \leq 0,05$) sind mit einem * gekennzeichnet.

Wie in der Abbildung 37 verdeutlicht, zeigen die verschiedenen Zellgruppen bereits vor LIFU deutliche Unterschiede in der Ausprägung ihres Spannungseinbruchs. Dieser Unterschied stellt sich allerdings im U-Test nach Mann-Whitney nicht signifikant dar. Die entsprechenden Werte sind in der folgenden Tabelle 21 dargestellt.

Tabelle 21: Darstellung der p-Werte des U-Tests nach Mann-Whitney für den Spannungseinbruch (mV) im Vergleich zur Kontrolle

	Delta	Gamma
Vor LIFU	0,16	0,19
nach 0 Minuten	0,47	0,00
nach 5 Minuten	0,40	0,17
nach 10 Minuten	0,02	0,43
nach 15 Minuten	0,16	0,06

Unmittelbar nach LIFU ist im Bereich der Gamma-Messung ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe derselben Zeitebene nachzuweisen (vgl. Abbildung 37). Hier sinkt die Amplitude der mit einer Repetitionsrate im Gamma-Frequenzbereich behandelten Zellen von etwa 2,0 mV auf 1,7 mV. Im Bereich der Delta-Messung stellt sich nach 10 min ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe dar, der auch im U-Test nach Mann-Whitney bestätigt wird (vgl. Tabelle 21). Hier fällt die Amplitude der mit einer Repetitionsrate im Delta-Bereich behandelten Zellen von etwa 2,5 mV vor LIFU auf 1,5 mV 10 min nach LIFU ab. 15 min nach LIFU zeigt sich keine Signifikanz mehr im Vergleich zur Kontrollgruppe. Deren mittlere Amplitude ist 15 min nach LIFU selbst auf etwa 1,5 mV abgesunken.

Im weiteren Verlauf wurde nun das Verhalten der einzelnen Zellpopulationen selbst untersucht. Hierzu wurde die Zellpopulation vor Ultraschallbehandlung als Kontrollgruppe festgelegt, um das Verhalten derselben Zellen über die Zeit in den darauffolgenden Messungen nach 0 min, nach 5 min, nach 10 min und nach 15 min analysieren zu können.

Eine zusammenfassende Darstellung findet sich in der folgenden Abbildung 38.

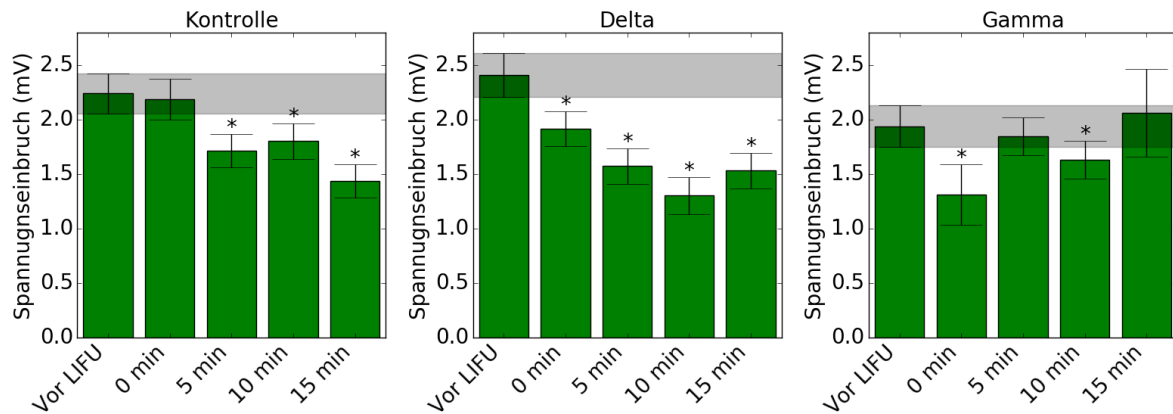


Abbildung 38: Darstellung des Spannungseinbruchs (mV) über die Zeit. Von links nach rechts: Kontrolle, Delta, Gamma. Als Referenzgruppe diente die jeweilige Zellpopulation eines Messprotokolls vor LIFU. Wie in der Abbildung dargestellt, zeigt sich besonders in der Zellpopulation der Kontrollmessung sowie der Deltamessung eine signifikante Abnahme des Spannungseinbruchs über die Zeit. Diese Unterschiede zu der Zellpopulation vor LIFU werden auch im Wilcoxon-Test bestätigt. Die grau hinterlegten Linien in der obigen Abbildung verdeutlichen, dass die Signifikanzen, mit Ausnahme der Gamma-Gruppe, außerhalb des angegebenen Fehlerbalkens der Messdaten vor LIFU liegen. Kontrolle $n = 10$; Delta $n = 6$, Gamma $n = 6$. Signifikanzen ($p \leq 0,05$) sind mit einem * gekennzeichnet.

Wie in der Abbildung 38 dargestellt, zeigt sich besonders in der Zellpopulation der Kontrollmessung sowie der Deltamessung eine signifikante Abnahme des Spannungseinbruchs über die Zeit. Die grau hinterlegten Linien in der oben dargestellten Abbildung 38 verdeutlichen, dass die Signifikanzen außerhalb des angegebenen Fehlerbalkens der Messdaten vor LIFU liegen. Im Bereich der Kontrollmessung zeigt sich eine beständige Abnahme der Amplitude, wobei der niedrigste Wert 15 min nach LIFU erreicht wird und bei etwa 1,5 mV liegt. In der Delta-Messung zeigt sich eine Abnahme des Spannungseinbruchs im Gegensatz zur Kontrolle, die erst nach 5 min eine signifikante Änderung zu vor LIFU aufweist, bereits 0 min nach LIFU. 10 min nach LIFU erreicht sie ihren niedrigsten Wert von etwa 1,4 mV, um im Anschluss daran wieder auf etwa 1,6 mV anzusteigen. Im Bereich der Gamma-Messung zeigen sich die dargestellten Werte deutlich schwankender als in den anderen beiden beschriebenen Messgruppen, wobei allerdings eine allgemeine Tendenz zu einem Anstieg des Spannungseinbruchs von etwa 1,8 mV auf 2,1 mV zu beobachten ist. Direkt nach Ultraschallapplikation (vgl. 0 min nach LIFU) zeigt sich zwischenzeitlich ein deutlicher Einbruch der Amplitude, der auch im Wilcoxon-Test signifikant ist (vgl. Tabelle 22), um im Anschluss daran wieder anzusteigen.

Tabelle 22: Darstellung der p-Werte des Wilcoxon-Tests für den Spannungseinbruch (mV) im Vergleich zu vor LIFU

	nach 0 min	nach 5 min	nach 10 min	nach 15 min
Kontrolle	0,26	0,00	0,00	0,00
Delta	0,00	0,00	0,00	0,00
Gamma	0,00	0,71	0,05	0,13

5.2.1.5 Entladungsverhalten

Um das Entladungsverhalten der einzelnen Zellen genauer zu analysieren, wurde die Zellmembran über 600 ms von -1 nA – 1 nA in 0,1 nA - Schritten depolarisiert. Hierbei zeigte sich die für die Pyramidenzellen typische Abhängigkeit der Entladung von der injizierten Stromstärke (vgl. Abbildung 15).

Eine grafische Darstellung der entsprechenden Auswertung findet sich in der folgenden Abbildung 39. Wie zuvor wurde auch hier die Anzahl der Aktionspotentiale ausgewertet.

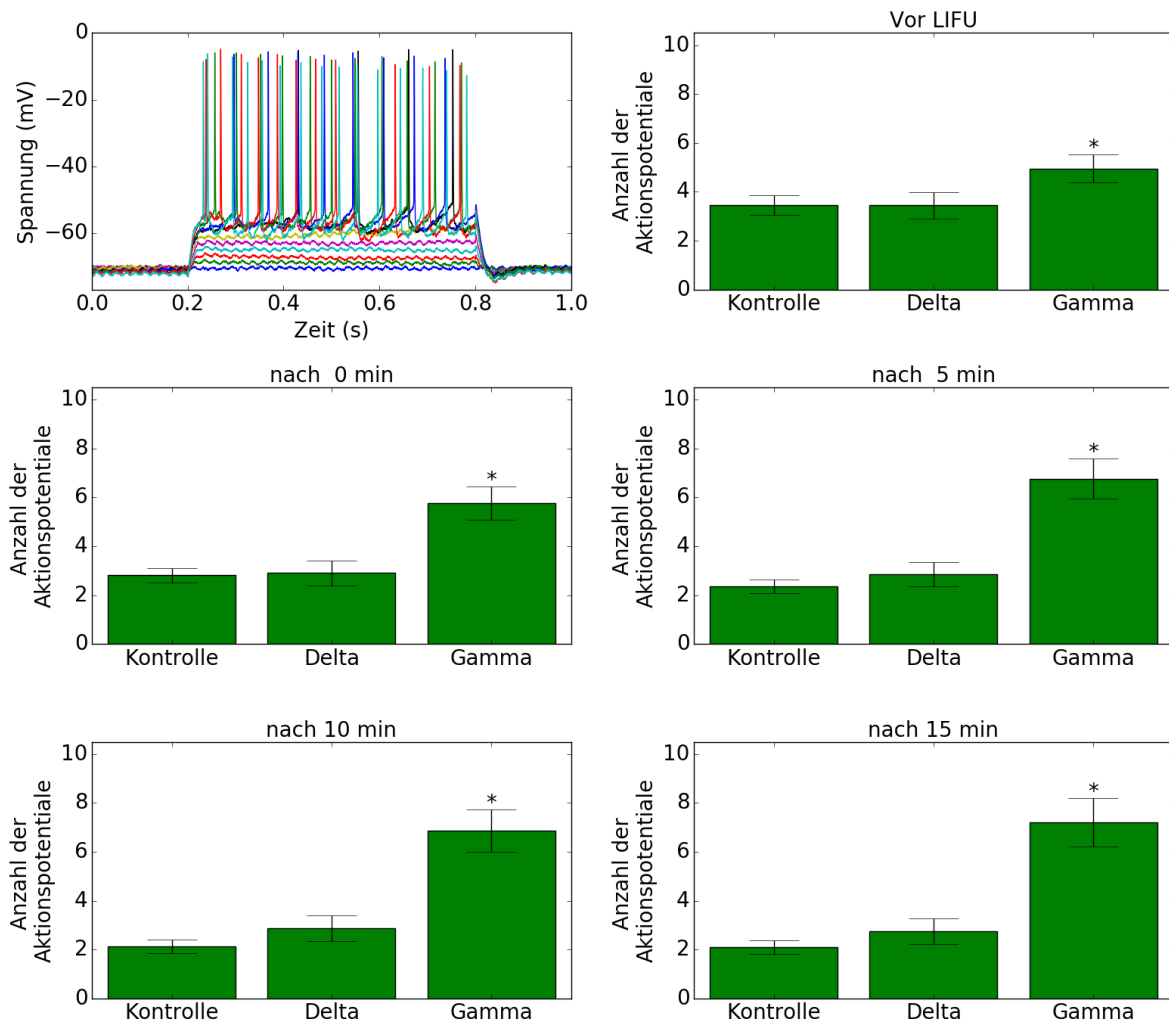


Abbildung 39: Darstellung des Entladungsverhaltens der Zellen über die Zeit. Links oben im Bild finden sich ausgewählte farbige Beispielspuren. In den sich anschließenden Grafiken (vor LIFU, nach 0 Minuten, nach 5 Minuten, nach 10 Minuten, nach 15 Minuten) findet sich eine Darstellung der Änderung des Entladungsverhaltens der verschiedenen Zellpopulationen über die Zeit nach Ultraschallapplikation. Als Referenzgruppe diente jeweils die Kontrolle der gleichen Zeitebene. Wie in der Abbildung dargestellt, zeigen die Kontrolle sowie die Delta-Gruppe kaum Änderungen in ihrem Entladungsverhalten über die Zeit. Im Vergleich hierzu zeigen sich deutliche Unterschiede bei den mit einer Repetitionsrate im Bereich der Gamma-Frequenz behandelten Zellen. Hier besteht bereits vor LIFU ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe, der sich in einer erhöhten Rate an Aktionspotentialen in der Gamma-Gruppe äußert. Kontrolle $n = 10$; Delta $n = 6$, Gamma $n = 6$. Signifikanzen ($p \leq 0,05$) sind mit einem * gekennzeichnet.

Wie in der Abbildung 39 dargestellt, zeigen die Kontrolle sowie die Delta-Gruppe kaum Änderungen in ihrem Entladungsverhalten über die Zeit. Die im Mittel angegebene Anzahl an

Aktionspotentialen liegt bei diesen beiden Gruppen kontinuierlich bei etwa 2-3 Aktionspotentialen. Im Vergleich hierzu zeigen sich deutliche Unterschiede bei den mit einer Repetitionsrate im Bereich der Gamma-Frequenz behandelten Zellen. Hier besteht bereits vor LIFU ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe, der sich in einer erhöhten Rate an Aktionspotentialen in der Gamma-Gruppe äußert. Dieser Unterschied zeigt sich auch im U-Test nach Mann-Whitney, dessen p-Werte im Folgenden tabellarisch angegeben sind.

Tabelle 23: Darstellung der p-Werte des U-Test nach Mann-Whitney für das Entladungsverhalten im Vergleich zur Kontrolle

	Delta	Gamma
Vor LIFU	0,31	0,02
nach 0 Minuten	0,22	0,00
nach 5 Minuten	0,47	0,00
nach 10 Minuten	0,39	0,00
nach 15 Minuten	0,45	0,00

Im Gegensatz zu den anderen beiden Gruppen, die sich durch ein gleichbleibendes Entladungsverhalten über die Zeit auszeichnen, steigt das Entladungsverhalten der Gamma-Gruppe mit zunehmender Messdauer an, um von etwa 4 Entladungen vor LIFU auf im Mittel 7 Entladungen 15 min nach LIFU anzusteigen.

Im Folgenden wurde das Verhalten der einzelnen Zellpopulationen selbst untersucht. Hierzu wurde die Zellpopulation vor Ultraschallbehandlung als Kontrollgruppe festgelegt, um das Verhalten derselben Zellen über die Zeit in den darauffolgenden Messungen nach 0 min, nach 5 min, nach 10 min und nach 15 min analysieren zu können. Eine zusammenfassende Darstellung findet sich in der folgenden Abbildung 40.

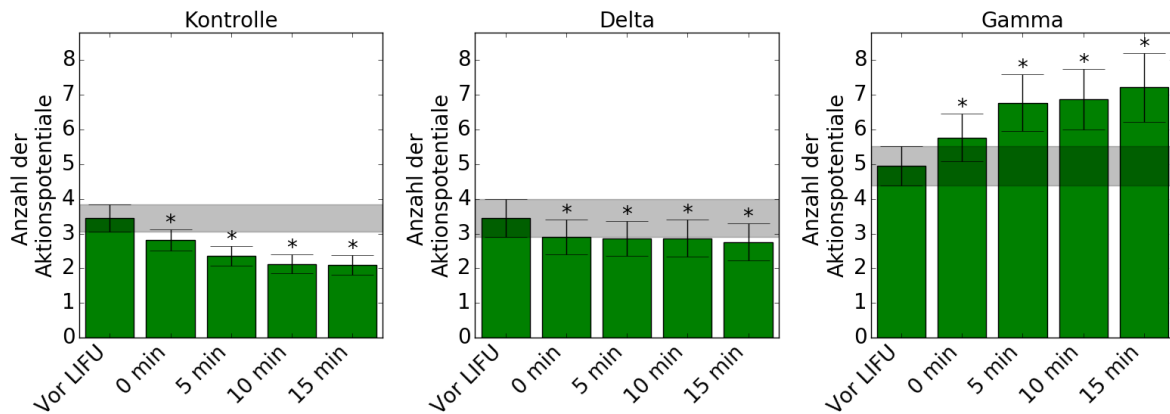


Abbildung 40: Darstellung des Entladungsverhaltens der Zellen über die Zeit. Von links nach rechts: Kontrolle, Delta, Gamma. Als Referenzgruppe diente die jeweilige Zellpopulation eines Messprotokolls vor LIFU. Es zeigt sich eine signifikante Verminderung der Anzahl der Aktionspotentiale über die Zeit in der Kontrollgruppe im Vergleich zu vor LIFU. Auch in der Gruppe des Delta-Protokolls zeigt sich eine deutliche Abnahme des Entladungsverhaltens nach LIFU, wobei die angegebenen Änderungen innerhalb des Fehlerbalkens liegen. Im Bereich der Gamma-Gruppe zeigt sich eine signifikante Zunahme an Entladungen über die Zeit im Vergleich zu derselben Zellgruppe vor LIFU, wobei der Maximalwert 15 min nach LIFU erreicht wird. Kontrolle $n = 10$; Delta $n = 6$, Gamma $n = 6$. Signifikanzen ($p \leq 0,05$) sind mit einem * gekennzeichnet.

Wie in der Abbildung 40 dargestellt, zeigt sich in der Kontrollgruppe eine signifikante Verminderung der Anzahl der Aktionspotentiale über die Zeit im Vergleich zu vor LIFU. Auch in der Gruppe des Delta-Protokolls zeigt sich eine deutliche Abnahme des Entladungsverhaltens nach LIFU. Dieses hält sich allerdings weitestgehend stabil bei 3 Entladungen und zeigt im Gegensatz zur Kontrollgruppe keine wesentliche weitere Abnahme über die Zeit. Im Bereich der Gamma-Gruppe ist, wie zuvor auch, eine allgemeine Zunahme an Entladungen zu beobachten. Diese stellt sich auch im Wilcoxon-Test als signifikant dar (Tabelle 24).

Tabelle 24: Darstellung der p-Werte des Wilcoxon-Tests für das Entladungsverhalten im Vergleich zu vor LIFU.

	nach 0 min	nach 5 min	nach 10 min	nach 15 min
Kontrolle	0,00	0,00	0,00	0,00
Delta	0,00	0,00	0,01	0,01
Gamma	0,00	0,00	0,00	0,01

5.2.2 Schwellenpotential

Im weiteren Verlauf wurden die strukturellen Veränderungen der jeweiligen Aktionspotentiale vor zu nach LIFU über die Stimulation analysiert (vgl. Abbildung 16).

Zunächst wurde hierfür das spontane Entladungsverhalten der einzelnen Zellen betrachtet.

Wie in Abbildung 41 deutlich wird, zeigte sich auch in dieser Messung eine signifikante Steigerung der einzelnen Spontanentladungen im Bereich des Gamma-Protokolls. Diese Änderung zeigt sich auch im U-Test nach Mann-Whitney signifikant, wobei $p \leq 0,05$.

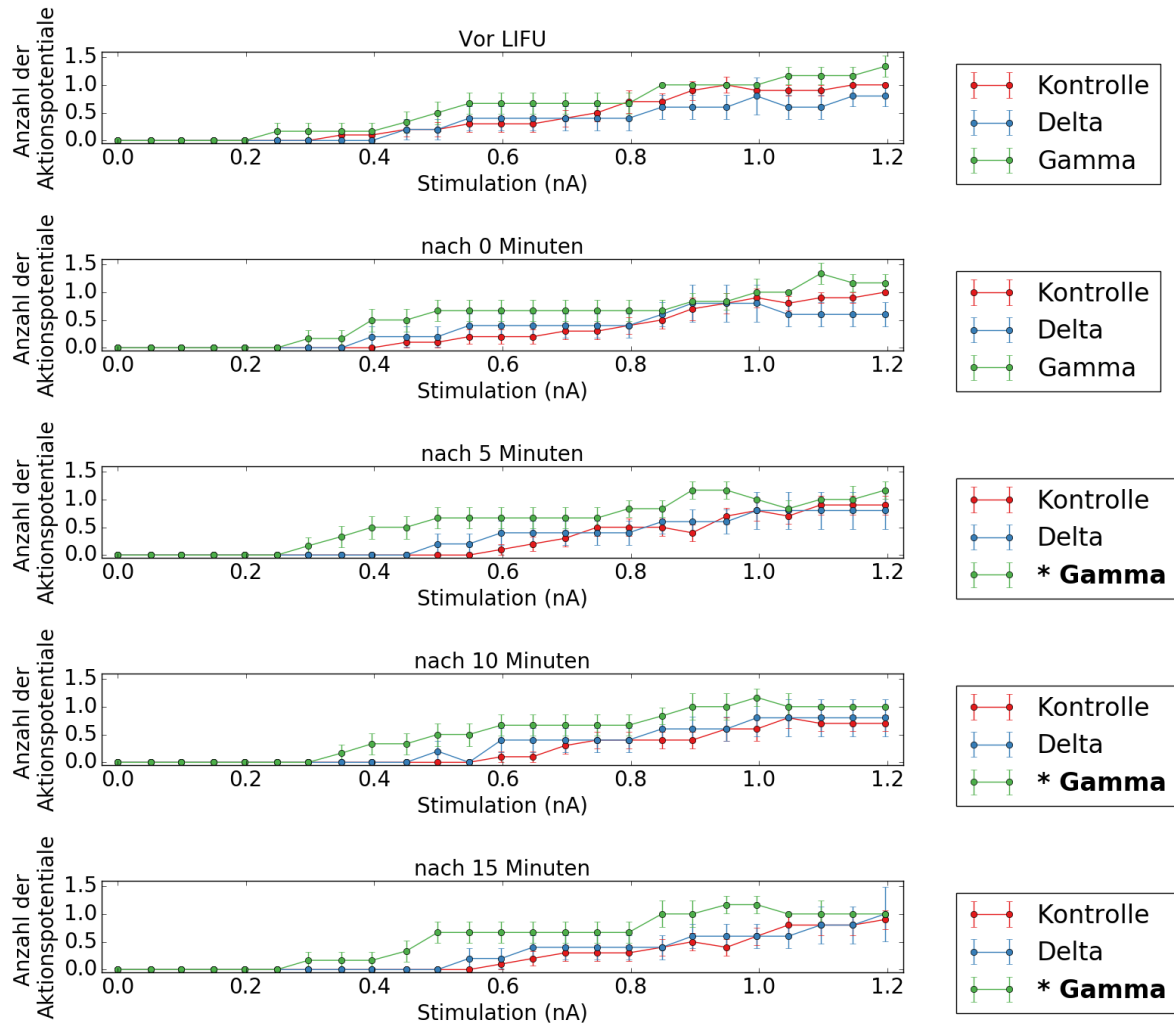


Abbildung 41: Anzahl der spontanen Einzelentladungen über die Stimulation. Wie in der Abbildung dargestellt, unterscheiden sich die einzelnen Stimulationsgruppen in ihrer Entladungshäufigkeit sowie in ihrem Entladungsbeginn. Während die Kontroll- und die Deltagruppe in Bezug auf Entladungsbeginn und -häufigkeit ein ähnliches Verhalten aufweisen, tritt in der Gamma-Gruppe eine frühere und häufigere Entladung auf, was sich auch im Mann-Whitney-Test widerspiegelt. Kontrolle $n = 10$; Delta $n = 6$, Gamma $n = 6$. Signifikanzen ($p \leq 0,05$) sind mit einem * gekennzeichnet.

Wie in der Abbildung 41 dargestellt, zeigt sich im Entladungsverhalten der Gamma-Gruppe eine signifikante Steigerung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Zunahme an Entladungen zeigt sich besonders 5 min nach LIFU, während der Kurvenverlauf der verschiedenen Messprotokolle davor weitestgehend deckungsgleich verläuft. Auffallend ist eine allgemeine Tendenz der Gamma-Zellen, früher Aktionspotentiale zu generieren. Während die Kontrollgruppe sowie die Delta-Gruppe vor LIFU erst ab etwa 0,4 nA zu Entladungen neigen, zeigen sich in der Gamma-Gruppe bereits bei 0,2 nA die ersten Entladungen. Diese beschriebenen Unterschiede spiegeln sich auch im Signifikanztest nach Mann-Whitney wider und sind in der folgenden Tabelle 25 aufgeführt.

Tabelle 25: p-Werte des U-Tests nach Mann-Whitney für die Anzahl der Aktionspotentiale. Als Vergleichsgruppe fungierte hierbei die Kontrollgruppe.

	Delta	Gamma
Vor LIFU	0,22	0,12
nach 0 Minuten	0,43	0,06
nach 5 Minuten	0,37	0,01
nach 10 Minuten	0,24	0,01
nach 15 Minuten	0,33	0,01

In wie weit sich dieses unterschiedliche Entladungsverhalten der jeweiligen Zellen auch innerhalb einer Messgruppe äußerte, wurde im Folgenden anhand der Analyse der einzelnen Zellpopulationen untersucht. Hierbei wurde die jeweilige Zellgruppe vor LIFU als Kontrolle festgelegt und die entsprechende Zellgruppe nach LIFU über die Zeit mit dieser verglichen, was in der folgenden Abbildung 42 mittels Balkendiagrammen dargestellt ist.

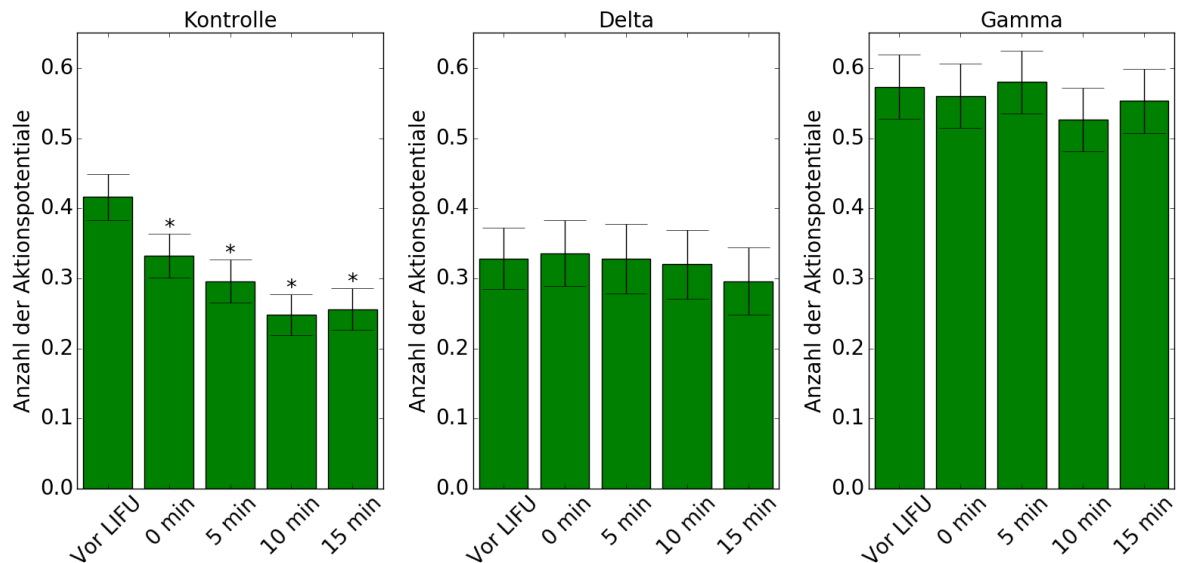


Abbildung 42: Darstellung der Entladungsneigung der einzelnen Messprotokolle über die Zeit. Wie in der Abbildung deutlich wird, zeigt die Kontrollgruppe eine signifikante Abnahme ihrer Aktionspotentiale über die Zeit. Das Verhalten der mit einer Repetitionsrate im Delta- und Gamma-Bereich behandelten Zellen zeigt sich weitestgehend stabil. Kontrolle $n = 10$; Delta $n = 6$, Gamma $n = 6$. Signifikanzen ($p \leq 0,05$) sind mit einem * gekennzeichnet.

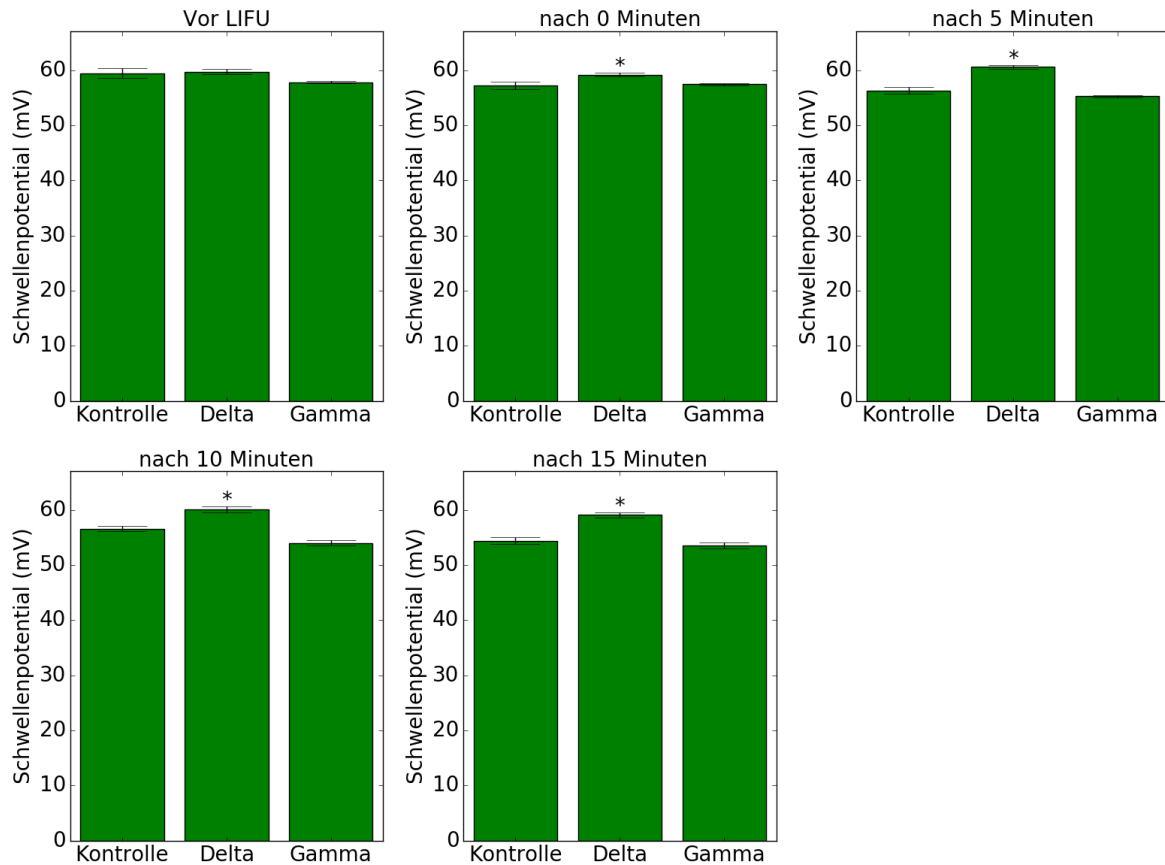
Wie in Abbildung 42 dargestellt, zeigen die Zellen der verschiedenen Messprotokolle ein unterschiedliches Entladungsverhalten über die Zeit, dass sich auch in den Ergebnissen des U-Tests nach Mann-Whitney widerspiegelt und im Folgenden dargestellt ist (vgl. Tabelle 26).

Tabelle 26: p -Werte des U-Tests nach Mann-Whitney für die Anzahl der Aktionspotentiale. Als Vergleichsgruppe fungierte hierbei die jeweilige Messung vor Ultraschall-Applikation.

	nach 0 min	nach 5 min	nach 10 min	nach 15 min
Kontrolle	0,00	0,00	0,00	0,00
Delta	0,89	0,46	1,00	0,20
Gamma	0,57	0,62	0,10	0,31

Während die mit Ultraschall behandelten Zellgruppen einen weitestgehend stabilen Verlauf in ihrer Entladungshäufigkeit besitzen, zeigen die Zellen der Kontrollgruppe eine signifikante Verminderung über die Zeit, die auch im U-Test nach Mann-Whitney bestätigt werden kann, wobei $p \leq 0,05$. Die allgemeine Tendenz der Gamma-Gruppe, früher und häufiger zu entladen, lässt sich hier nicht nachweisen (vgl. u.a. Abbildung 41).

Im Folgenden wurde das Schwellenpotential der jeweiligen Zellen analysiert, um eine Aussage über die jeweilige Neigung zu Entladungen innerhalb der verschiedenen Messprotokolle treffen zu können. Wie sich in der folgenden Abbildung 43 zeigt, ergeben sich hierbei signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den mit einem Delta-Stimulationsmuster behandelten Zellen.



*Abbildung 43: Darstellung des Betrages des Schwellenpotentials über die Zeit. Vor der Ultraschall-Applikation liegen die Schwellenpotentiale übereinstimmend bei rund 60 mV. Nach der Ultraschall-Applikation sinken die Schwellenpotentiale in der Kontroll- und Gamma-Gruppe ab, während die der Delta-Gruppe konstant bleiben. Kontrolle $n = 10$; Delta $n = 6$, Gamma $n = 6$. Signifikanzen ($p \leq 0,05$) sind mit einem * gekennzeichnet.*

Wie in der Abbildung 43 dargestellt, zeigen die Schwellenpotentiale der verschiedenen Messgruppen (Kontrolle, Delta, Gamma) vor LIFU nur wenig interzelluläre Abweichungen und liegen bei einem Potential von etwa 60 mV im Betrag. Dieses Verhalten ändert sich nach LIFU: Während das Schwellenpotential der Gamma-Gruppe sowie der Kontrollgruppe mit zunehmender Zeit ansteigt und sich 15 min nach LIFU im Bereich von etwa 50 mV im Betrag darstellt, liegt das Schwellenpotential der mit einer Repetitionsrate im Bereich der Delta-

Frequenz behandelten Zellen auch 15 min nach LIFU stabil bei etwa 60 mV im Betrag. Für den Vergleich zur Kontrollgruppe zu den verschiedenen Zeitpunkten ergeben sich im Mann-Whitney-U-Test die in Tabelle 27 aufgeführten p-Werte.

Tabelle 27: p-Werte des U-Tests nach Mann-Whitney für die Schwellenpotentiale (mV). Als Vergleichsgruppe fungierte hierbei die Kontrollgruppe zu den jeweiligen Zeitpunkten.

	Delta	Gamma
Vor LIFU	0,46	0,41
nach 0 Minuten	0,03	0,19
nach 5 Minuten	0,00	0,07
nach 10 Minuten	0,01	0,37
nach 15 Minuten	0,00	0,10

Im weiteren Verlauf wurde das Verhalten der einzelnen Zellgruppen über die Zeit analysiert. Auch hier zeigte sich das zuvor beschriebene Verhalten und ist in der folgenden Abbildung 44 vergleichend dargestellt.

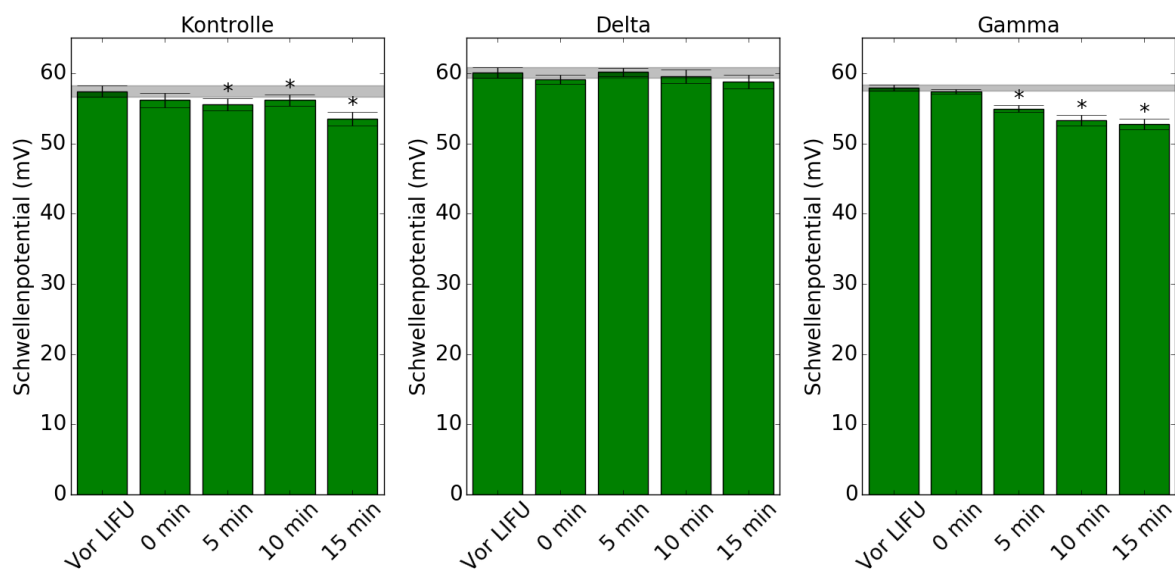


Abbildung 44: Darstellung des Betrages des Schwellenpotentials über die Zeit (mV).

Innerhalb der verschiedenen Messgruppen zeigt sich ein unterschiedliches Verhalten der Zellen (vgl. Kontrolle, Delta, Gamma) bezüglich ihres Schwellenpotentials über die Zeit.

*Während in der Kontrolle sowie der Gamma-Gruppe eine Abnahme des Schwellenpotentials über die Zeit zu beobachten ist, zeigen sich die Daten der Delta-Gruppe in ihrem Verlauf über die Zeit stabil. Kontrolle $n = 10$; Delta $n = 6$, Gamma $n = 6$. Signifikanzen ($p \leq 0,05$) sind mit einem * gekennzeichnet.*

Wie in der Abbildung 44 dargestellt, zeigt sich innerhalb der verschiedenen Messgruppen (vgl. Kontrolle, Delta, Gamma) ein signifikant unterschiedliches Verhalten der Zellen bezüglich ihres Schwellenpotentials über die Zeit. Die entsprechenden p-Werte des U-Tests nach Mann-Whitney sind hierfür in der folgenden Tabelle 28 aufgeführt.

Tabelle 28: p-Werte des U-Tests nach Mann-Whitney für die Schwellwertpotentiale. Als Vergleichsgruppe fungierte hierbei die jeweilige Messung vor Ultraschall-Applikation.

	nach 0 min	nach 5 min	nach 10 min	nach 15 min
Kontrolle	0,07	0,02	0,03	0,00
Delta	0,20	0,29	0,27	0,12
Gamma	0,07	0,00	0,00	0,00

Wie zuvor beschrieben, ist im Bereich der Kontrollgruppe sowie der mit einer Repetitionsrate im Bereich der Gamma-Frequenz behandelten Zellen eine signifikante Positivierung des Schwellenpotentials nach LIFU im Vergleich zu vor LIFU über die Zeit zu beobachten. Dieses Verhalten zeigt sich nicht in der mit einer Repetitionsrate im Bereich der Delta-Frequenz behandelten Zellen und ist Gegenstand der nachfolgenden Diskussion.

6 Diskussion

Low intensity focused ultrasound (LIFU) als mögliche Therapieoption der medikamentenrefraktären Epilepsie ist Gegenstand derzeitiger Forschung. Durch die Applikation von LIFU kann die Generierung epileptischer Aktivität im Säugetiergehirn maßgeblich beeinflusst werden [34]. Die diesem Mechanismus zu Grunde liegende Wirkung des Ultraschalls konnte jedoch bis heute nicht eindeutig zugeordnet werden.

Diskutiert werden unter anderem eine Beeinflussung der intrinsischen Membraneigenschaften sowie des synaptischen Einstroms. Durch die unterschiedliche Zusammensetzung der Membrantransportproteine in den Nervenzellen reagieren diese verschieden auf interne und externe Reize. Wie in Kapitel 1 dargestellt, zeigen mehrere wissenschaftliche Studien, dass Ultraschall-Applikation einen hemmenden Effekt auf die zelluläre Erregbarkeit haben kann. Dies kann durch die Messergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (vgl. Kapitel 5).

Die zellulären neurologischen Mechanismen, auf denen die Wirkung des Ultraschalls beruht, sind noch nicht in allen Einzelheiten bekannt. Eine wichtige Grundvoraussetzung scheint jedoch die oszillatorische Eigenfrequenz der einzelnen Nervenzellen zu sein, die auf den jeweiligen individuellen Membranleitfähigkeiten beruht [94]. Pyramidenzellen der hippocampalen CA1-Region zeichnen sich durch einen oszillatorischen Grundrhythmus im Bereich der Theta-Frequenz (4 – 7 Hz) aus. GABAerge Interneuronen besitzen ebenfalls einen eigenen Grundrhythmus. Dieser hat jedoch ein breiteres Frequenzspektrum und unterscheidet sich stark in den unterschiedlichen Subgruppen [95]. Im Gegensatz zu den Pyramidenzellen, deren Grundoszillation zum Großteil von HCN1- und HCN2-Kanälen an den distalen Dendriten getragen wird, ist über den elektrophysiologischen Mechanismus der Oszillationen inhibitorischer Zellen nur wenig bekannt. Wie Pike et al. [95] in wissenschaftlichen Untersuchungen an Ratten-Hippocampus-Schnitten nachweisen konnte, unterscheiden sich die oszillatorischen Eigenschaften der jeweiligen Interneuronen stark in Abhängigkeit ihrer neuroanatomisch-histologischen Lage: Horizontale Interneuronen reagieren analog der hippocampalen Pyramidenzellen verstärkt auf oszillatorischen Einfluss im Bereich des Theta-Rhythmus. Die intrinsische Eigenfrequenz GABAerger Interneuronen im Bereich des *stratum pyramidale* des Hippocampus ist besonders im Gamma-Frequenzbereich einzuordnen. Wie in einigen Studien beschrieben, wird der jeweilige Gamma-Rhythmus maßgeblich durch die Eigenschaften von GABA_A-Rezeptoren bestimmt [77], [83]. Diese prägen durch ihre verschiedenen Untereinheiten auch die Subgruppierung in die unterschiedlichen Frequenzgruppen aus schnellem, mittelschnellem

und langsamem Gamma-Rhythmus [77]. Die in den Interneuronen vorzufindenden HCN-Kanäle scheinen nicht an der Generierung der Gamma-Oszillationen beteiligt und nur von untergeordneter Bedeutung zu sein. Im Vergleich zu den Pyramidenzellen ist ihre Verteilung weniger dicht und vor allem dem Subtyp 2 und 4 zuzuordnen [93].

Delta-Oszillationen unterscheiden sich von den zuvor genannten durch ihre mangelnde Zellspezifität [96]. Diese Oszillationen sind hauptsächlich in Ruhe und tiefem Schlaf nachzuweisen und nicht einer bestimmten Gruppe an Neuronen zuzuordnen [96]. Während der verschiedenen Schlafphasen, die im Kapitel 2 bereits näher erläutert wurden, kommt es je nach Tiefe des Schlafzyklus sowohl zu geordneten als auch zu ungeordneten oszillatorischen Ereignissen in Form von steilen Wellen und Feldoszillationen.

Diese histologisch-neurophysiologischen Eigenschaften der verschiedenen Zellgruppen und ihre mögliche Beeinflussung durch Ultraschall-Applikation, u.a. im Hippocampus, spiegeln sich auch in den hier dargestellten Messdaten wider (vgl. Kapitel 5). Im Bereich der extrazellulären Messungen zeigt sich in der Auswertung der Spontanaktivität nach LIFU eine deutliche Änderung der Anzahl der spontanen Entladungen im Vergleich zur Kontrollgruppe (vgl. Abbildung 23 bis Abbildung 25). In der Messgruppe des Delta-Protokolls ist eine signifikante Reduzierung sowohl in der Gesamtzahl der Entladungen als auch in der Einzelauswertung der Einfachentladungen und Mehrfachentladungen zu beobachten. Diese ist für eine frühere Applikation von LIFU im Delta-Frequenzbereich stärker ausgeprägt.

In der Auswertung des Gamma-Protokolls zeigen sich ebenfalls deutliche Änderungen in Relation zur Kontrollgruppe. Auch hier ist der Zeitpunkt der LIFU-Applikation wesentlich für den zu beobachtenden Effekt: Während eine initiale Behandlung der Gehirnschnitte mit einer Repetitionsrate im Bereich der Gamma-Frequenz zu einer allgemeinen Verminderung der Spontanaktivität sowohl bei den Einfachentladungen als auch bei den Mehrfachentladungen führt, zeigt sich in der Gruppe LIFU final Gamma zunächst eine Zunahme der Einfachentladungen. Die Gesamtzahl sowie die Anzahl der Mehrfachentladungen zeigen jedoch eine signifikante Verminderung im Vergleich zur Kontrollgruppe.

In der Gesamtheit betrachtet, stellt sich in den hier dargestellten Messdaten die Wirkung einer Applikation von LIFU im Bereich der Delta-Frequenz am stärksten dar. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass es sich bei den Temporallappenepilepsien um iktale Ereignisse handelt, die vorrangig auf dem Verlust mehrerer zellulärer Eigenschaften und Stabilitäten beruhen. Diese sind sowohl im Bereich der hemmenden Interneuronen als auch auf der Basis der Pyramidenzellen anzutreffen. Mit Hilfe der zellunspezifischen Wirkung der Delta-Frequenz

scheint es möglich, ein allgemeines Ansprechen dieser unterschiedlichen Zellgruppen zu generieren. Dies steht im Einklang mit neurowissenschaftlichen Studien, die zeigen, dass Delta-Oszillationen eine wesentliche Rolle in der Beeinflussung epileptischer Aktivität zukommt [73]. Der alternierende Wechsel zwischen *up*- und *downstates*, der bevorzugt während des Schlafes auftritt, bildet hierbei möglicherweise eine wesentliche physiologische Grundlage [97]. Durch die in den durchgeführten Versuchen verwendete Ultraschall-Applikation im Delta-Rhythmus scheint es möglich, diese Frequenz auf die hippocampalen Neuronen der CA1-Region aufgelagert und so die Neigung zu iktalen Ereignissen reduziert zu haben. Dies entspricht auch den Forschungsergebnissen von Butler und Paulsen [74], die eine entsprechende zelluläre Frequenzinduktion im Bereich des Gamma-Rhythmus bereits nachgewiesen haben.

Der Effekt der Ultraschallapplikation im Gamma-Frequenzbereich zeigt sich in den hier durchgeführten Messungen weniger deutlich als im Bereich der Delta-Frequenz. Zudem lässt sich in der Messgruppe LIFU final Gamma eine Zunahme an Einfachentladungen bei gleichzeitiger Verminderung der Mehrfachentladungen nachweisen. Da die verschiedenen neuronalen Zellgruppen nachgewiesenermaßen unterschiedlich gut auf die applizierten Frequenzbereiche ansprechen [95], ist es möglich, dass durch die Applikation von Ultraschall im Bereich der Gamma-Frequenz vorrangig hippocampale Interneuronen angeregt wurden, die in ihrer eigenen Grundfrequenz diesem Rhythmus entsprechen. Diese haben möglicherweise über mehrere Zwischenschritte die Spontanaktivität der Pyramidenzellen reduziert. Dieser mehrstufige Verschaltungskreis sowie das individuell bessere Ansprechen einzelner Zellgruppen auf die applizierte Gamma-Frequenz stellt einen möglichen Erklärungsansatz für die hier vorliegenden Messergebnisse dar. Inwieweit die Zunahme an Einfachentladungen in der Messung LIFU final Gamma auf diese Theorie zurückzuführen ist, müsste in zukünftigen Studien untersucht werden. Allerdings zeigt sich auch in den intrazellulären Messungen eine allgemeine Zunahme des Entladungsverhaltens der Zellen nach Gamma-Beschallung. Ein möglicher Erklärungsansatz für dieses Verhalten der mit einer Repetitionsrate im Bereich der Gamma-Frequenz behandelten Zellen liefert Ben-Ari et al. [48]. Dieser beschreibt einen umschlagenden Effekt von erregender zu hemmender Wirkung im Bereich der GABA-Rezeptoren mit zunehmender Reife des Gehirns. Ob Ultraschall eine ähnliche Wirkung induziert und warum die Zunahme an Einfachentladungen nicht auch in der Gruppe LIFU initial Gamma zu beobachten ist, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen. Es ist davon auszugehen, dass Messungenauigkeiten sowie Schwankungen innerhalb der Zellqualitäten die hier vorliegenden Ergeb-

nisse beeinflussen. Des Weiteren wurden die Gehirnschnitte mit einer Frequenz von 50 Hz beschallt. Da das Frequenzspektrum der Gamma-Oszillationen - wie bereits oben dargestellt - eine breite Verteilung aufweist und in schnell, mittelschnell und langsam eingeteilt wird, scheint ein vermindertes Ansprechen der Zellen in Abhängigkeit von der applizierten Frequenz wahrscheinlich. Zudem ist über die genaue Lokalisation sowie den eigentlichen Mechanismus der Gamma-Oszillationen bisher wenig bekannt. Dies erschwert sowohl die Wirkungsanalyse als auch die Wahl des optimalen Frequenzspektrums [98], [99]. Während Traub et al. [98] vor allem Gap junctions auf die Generierung schneller Gamma Oszillationen (> 70 Hz) zurückführt, konnte Bragin et al. [99] nachweisen, dass besonders der *Gyrus dentatus* für die Aufrechterhaltung und Initiierung der Gamma-Frequenz von Bedeutung ist. Er nimmt an, dass Gamma-Wellen auf Wechselwirkungen zwischen den intrinsischen oszillatorischen Eigenschaften von Interneuronen an den Somata von Körnerzellpopulationen und den Netzwerkeigenschaften des Gyrus dentatus beruhen. Fisahn et al. [100] beschreibt hingegen eine verstärkte Abhängigkeit der Gamma-Oszillationen von AMPA- und von Kainat-Rezeptoren. Letztere sind vor allem im Bereich der hippocampalen CA3-Region mit erhöhter Dichte angeordnet, sodass er besonders diese Lokalisation als Ursprung der Gamma-Oszillationen ansieht. Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden im Bereich der hippocampalen CA1 Region durchgeführt. Ein vermindertes Ansprechen der jeweiligen Zellen scheint daher möglich zu sein. Des Weiteren differieren die verschiedenen Forschungsansätze nicht nur in der zeitlichen Durchführung ihrer Versuche, sondern auch in ihrem Aufbau: Während Bragin et al. [99] seine Experimente an lebenden Ratten durchführte, fertigte Fisahn et al. [100] Ratten-Hippocampus-Schnitte für entsprechende in vitro Versuche an.

Auf die synaptische Transmission via Schaffer-Kollateralen zwischen CA3 und CA1 konnte in keinem Messprotokoll eine signifikante Beeinflussung durch Ultraschall nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 5.1.2). Vielmehr zeigen sich die Daten in den Messungen vor und nach LIFU weitestgehend stabil. Dies ist sowohl im Verhalten der Amplitude als auch der Steigung zu beobachten und entspricht den Ergebnissen anderer Studien. So konnte Rempe et al. [101] experimentell an Ratten-Hippocampus-Schnitten nachweisen, dass die synaptische Transmission via Schaffer-Kollateralen keinen Einfluss auf die interneuronale synaptische Aktivität in der Temporallappenepilepsien zu besitzen scheint. Die hier vorliegenden Daten bestärken diese Annahme.

Wie andere neurowissenschaftliche Studien zeigen, bleibt die Konzentration der verschiedenen Neurotransmitter nach Applikation von LIFU jedoch nicht unbeeinflusst.

So konnte Yang et al. 2012 [16] nachweisen, dass sich Ultraschall-Applikation am Hirngewebe sowohl negativ als auch positiv auf einige extrazellulär zu messende Neurotransmitterkonzentrationen auswirkt. Hierbei scheinen die extrazellulären Konzentrationen an Dopamin und Serotonin durch die Applikation von Ultraschall anzusteigen. Wie durch Schmitz et al. nachgewiesen [102], besitzt besonders letzteres einen hemmenden Einfluss auf die Entwicklung schneller und langsamer IPSPs (inhibitorisches postsynaptisches Potential) in den verschiedenen hippocampalen Interneuronen. Schnelle IPSPs finden sich besonders im Stratum pyramidale und bewirken einen perisomatischen inhibitorischen Einfluss an den jeweiligen Pyramidenzellen, während langsame IPSPs verstärkt horizontal im Bereich der hippocampalen CA1-Region angeordnet sind [95]. Die genaue neurologische Wirkung des Serotonins konnte noch nicht abschließend geklärt werden und ist Gegenstand derzeitiger neurowissenschaftlicher Diskussionen. Eine Beteiligung von 5-HT_{1A}-Rezeptoren scheint jedoch von Bedeutung zu sein. Daher lässt sich eine mögliche Beeinträchtigung der inhibitorischen Wirkung GABAerger Interneuronen in der CA1-Region des Hippocampus durch nach LIFU freigesetzte Transmitter wie dem Serotonin nicht ausschließen. Dies legt nahe, dass mit der Erhöhung der extrazellulären Serotonin-Konzentration nach LIFU eine mögliche Zunahme spontaner Entladungen in der CA1-hippocampalen Region einhergeht. Die Zunahme an spontanen Einzelentladungen im Bereich des Gamma-Protokolls (vgl. LIFU final Gamma) kann vermutlich zum Teil auf diese Wirkung des Ultraschalls zurückgeführt werden. Um hierüber eine genaue Aussage treffen zu können, sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig. Unter anderem muss die Serotoninkonzentration im synaptischen Spalt in Abhängigkeit des applizierten Frequenz- und Intensitätsspektrums des Ultraschalls bestimmt werden.

Yang et al. [16] konnte nachweisen, dass die Konzentration des in der Regel exzitatorisch wirkenden Glutamats weitestgehend unbeeinflusst bleibt. Dies steht zum Teil in Widerspruch zu anderen Forschungsergebnissen [14]. Glutamat dient als Ausgangssubstanz zur Synthese des inhibitorisch wirkenden Neurotransmitters GABA. Dessen extrazellulär gemessene Konzentration zeigt sich nach Ultraschall-Applikation vermindert [16]. Welcher neurophysiologische Mechanismus dieser Reduktion zu Grunde liegt, ist noch nicht abschließend geklärt. Da die mechanische Wirkung des Ultraschalls ein möglicher Erklärungsansatz ist, kann angenommen werden, dass durch die Applikation von LIFU natriumabhängige GABA-Rezeptoren aktiviert werden und dies zu einer Rückaufnahme des Neurotransmitters in die jeweiligen Zellen führt. Ein hemmender Einfluss auf die Entstehung von GABA kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden und muss in folgenden neurowissenschaftlichen Experimenten genauer untersucht werden [16].

GABA entfaltet seine Wirkung vornehmlich an zwei Rezeptorsubklassen. Diese sind bereits in der Einleitung näher beschrieben worden: GABAA- und GABAB-Rezeptoren.

Während eine Aktivierung von GABAB-Rezeptoren sowohl zu einer Erhöhung der Inzidenz von Komplexen an spitzen Wellen und somit zu verstärkter epileptischer Aktivität [73] als auch zu einer Terminierung des pyramidalen *upstates* führt [86], wird durch die Wirkung des GABAA-Rezeptors eine Stabilisierung der Delta-Oszillationen sowie eine Reduktion des Auftretens von Spindeln im EEG gefördert. Diese Wirkung geht einher mit einem verminderten Auftreten iktaler Ereignisse [103]. Inwieweit dieser stabilisierende Effekt den hier dargestellten Daten zugrunde liegt, kann jedoch nicht abschließend geklärt werden. Auch das optimale Frequenz- und Intensitätsspektrum des Ultraschalls ist Gegenstand weiterer Forschungen. Allerdings präsentiert sich in den dargestellten Messergebnissen der hier vorliegenden Arbeit eine signifikante Verminderung an spontanen Entladungen im Bereich der verschiedenen Messprotokolle. Insbesondere bei der Applikation von Ultraschall mit einer Repetitionsrate im Bereich der Delta-Frequenz kann eine Wirkung beobachtet werden. Eine Beeinflussung der GABAA-Rezeptoren scheint daher ein möglicher Mechanismus der Einflussnahme durch Ultraschall und sollte Gegenstand weiterführender Experimente sein.

Der stabilisierende Effekt des Ultraschalls auf bestehende Grundrhythmen könnte auch ein möglicher Erklärungsansatz für die zum Teil kontroversen Aussagen verschiedener neurowissenschaftlicher Studien sein. So beschreibt Tominaga et al. [87] einen hemmenden Effekt auf iktale Ereignisse während high frequency stimulus (HFS) mit Frequenzen von mehr als 100 Hz. Auch Zylla et al. [72] stellt eine Modulierung und Stabilisierung im Bereich der steilen Wellen und Feldoszillationen der spatiotemporalen Aktivität von neuronalen Gruppen sowie der neuronalen Netzwerkeinheit durch Gamma-Oszillationen dar.

Des Weiteren muss beachtet werden, dass schnelle Oszillationen zwar an der Generierung iktaler Ereignisse beteiligt sind, diese jedoch auch in Form schneller, geordneter Entladung physiologisch in unserem Gehirn vorzufinden sind [104]. Es ist anzunehmen, dass für die stabilisierende Wirkung des Ultraschalls weiteren Parametern wie Frequenzeinstellung, Dauer und Intensität sowie der Lokalisation der Ultraschall-Applikation eine wesentliche Bedeutung zukommt. Zudem scheint es möglich, dass die entsprechenden Interneuronen durch die 50 Hz Einstellung in den durchgeführten Messungen nicht genügend angeregt worden sind. Wie bereits Senior et al. [82] dargestellt hat, beschränkt sich das Frequenzspektrum der CA1-hippocampalen Region im Bereich der Gamma-Oszillationen maßgeblich auf einen Frequenzbereich von 80 Hz. Des Weiteren konnte Colom et al. [105] einen hemmenden Einfluss des

langsamen Theta-Rhythmus auf die Entwicklung spontaner epileptischer Ereignisse im Bereich des Hippocampus von Nagetiergehirnen nachweisen. Somit scheint eine positive Beeinflussung der oszillatorischen Mechanismen durch die Applikation von LIFU besonders im Bereich langsamer Repetitionsraten ein möglicher Therapieansatz in der Behandlung neuronaler Erkrankungen wie der (medikamentenrefraktären) Temporallappenepilepsien zu sein.

Inwieweit die applizierte Ultraschallfrequenz Einfluss auf die jeweiligen Membraneigenschaften der Zellen nimmt, wurde in den intrazellulären Messungen untersucht. Hierdurch konnten besonders die passiven Membranparameter sowie das Entladungsverhalten und die Schwellenpotentiale der Aktionspotentiale analysiert werden.

Wie zuvor in den extrazellulären Messungen, zeigten sich auch hier signifikante Änderungen in Abhängigkeit der applizierten Repetitionsmuster. Während der Eingangswiderstand sowohl im Vergleich zur Kontrollgruppe, als auch innerhalb eines Messprotokolls über die Zeit unbeeinflusst bleibt, zeigen sich im Bereich der Zeitkonstante τ deutliche Schwankungen. Diese bestehen im Bereich des Gamma-Protokolls im Vergleich zur Kontrollgruppe bereits vor LIFU. Im Bereich des Delta-Protokolls sind vor LIFU keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe zu beobachten. Allerdings zeigt sich hier 0 min nach LIFU-Applikation, eine signifikante Zunahme der Zeitkonstante τ im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Variabilität der Messdaten konnte in der sich anschließenden zellgruppeninternen Analyse nicht bestätigt werden. Hier zeigt sich in allen Messprotokollen (Kontrolle, Delta, Gamma) eine signifikante Verminderung der Zeitkonstante τ über 15 min im Vergleich zu vor LIFU. Diese Abnahme erfolgt jedoch unterschiedlich schnell und zeigt sich am deutlichsten in der Kontrollgruppe, während sie in den Zellen des Gamma-Protokolls und des Delta-Protokolls weniger ausgeprägt ist. Diese Ergebnisse gehen einher mit der Hypothese, dass durch Ultraschall mit Repetitionsraten im niedrigen Frequenzbereich ein stabilisierender Effekt auf neuronale Netzwerke ausgeübt werden kann. Je niedriger die Zeitkonstante τ ist, desto schneller kann die Zelle wieder erregt werden [106]. Da die Membranzeitkonstante das Produkt aus Eingangswiderstand und Kapazität darstellt, sollte eigentlich angenommen werden, dass sie sich in den jeweils untersuchten Gruppen nicht ändert. Wie zu Beginn der Diskussion der passiven Membraneigenschaften der Zellen dargestellt, zeigt der Eingangswiderstand keine signifikanten Änderungen über die Zeit und auch die Zellgröße (und damit die Kapazität) sollte durch Ultraschall unbeeinflusst geblieben sein. Dennoch zeigen sich die Werte der Membranzeitkonstante τ in den verschiedenen Messprotokollen deutlich abnehmend. Möglicherweise stellt diese Tatsache einen Hinweis auf die zunehmende Instabilität des Systems dar: Die Zel-

len werden über die Zeit löchrig, wodurch die Membranzeitkonstante τ zunächst abnimmt, bevor die Zelle endgültig stirbt. Diese Hypothese geht auch einher mit der Beobachtung der Positivierung des Schwellenpotentials in der Einzelanalyse der Aktionspotentiale: Eine löchrige Zelle bietet positiv geladenen Kationen die Möglichkeit, entsprechend ihrem Konzentrationsgefälle in das Zellinnere zu strömen und die Zelle dadurch in einen zunehmend instabilen Zustand zu versetzen.

In der Analyse der Nachhyperpolarisation konnte innerhalb des Delta-Protokolls 0 Minuten und 5 Minuten nach LIFU eine signifikante Verminderung der Nachhyperpolarisation nachgewiesen werden. Diese hielt jedoch nicht bis 15 min nach LIFU an. Im Bereich des Gamma-Protokolls zeigt sich eine allgemeine Tendenz der Zunahme der Nachhyperpolarisation im Vergleich zur Kontrollgruppe. Allerdings stellt sich diese in den hier vorgestellten Daten nicht signifikant dar. Ob diese beschriebene gegensätzliche Entwicklung auf das applizierte Repetitionsmuster zurückzuführen ist, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden und ist Gegenstand weiterer Untersuchungen. Auffallend ist jedoch, dass in der internen Analyse der jeweiligen Zellgruppen, sowohl die Kontrollgruppe als auch die Zellen des Gamma-Protokolls ein ungleichmäßiges Bild der Amplitudenentwicklung ihrer Nachhyperpolarisation aufweisen. Letztgenannte Gruppe zeigt auch hier eine Zunahme der Nachhyperpolarisation. Diese stellt sich aber nicht signifikant im Vergleich zu vor LIFU dar. Im Bereich des Delta-Protokolls sind keine vergleichbaren Unregelmäßigkeiten nachzuweisen. Hier zeigt sich eine gleichmäßige Verminderung der Amplitude der Nachhyperpolarisation. Ob diese Beobachtungen mit der allgemein angenommenen stabilisierenden Wirkung des Ultraschalls im Bereich der Delta-Frequenz in Verbindung gebracht werden kann, bleibt allerdings Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Auch im Bereich des Spannungseinbruchs ergibt sich in Abhängigkeit des zugrunde liegenden Messprotokolls ein sehr inhomogenes Bild. Während im Bereich des Delta-Protokolls im Vergleich zur Kontrollgruppe zunächst eine signifikante Verminderung über die Zeit beobachtet werden kann, zeigen die Zellen des Gamma-Protokolls auch hier sowohl im Vergleich zur Kontrollgruppe als auch später in der spezifischen Analyse der Zellgruppen (Kontrolle, Delta, Gamma) eine tendenzielle Neigung zur Steigerung der Amplitude ihres Spannungseinbruchs. Im Gegensatz dazu ist sowohl bei den Zellen des Delta-Protokolls als auch innerhalb der Kontrollgruppe eine zunehmende Verminderung des Spannungseinbruchs über die Zeit zu beobachten. In wie weit diese Beobachtungen auf zellinterne Instabilitäten zurückzuführen sind, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen. Zudem ist anzunehmen, dass durch die Applikation von Ultraschall mit einem Repetitionsmuster im Delta- oder Gamma-Frequenzbereich die

HCN-Kanäle der hippocampalen Region beeinflusst werden können. HCN-Kanäle sind maßgeblich an der Generierung des Spannungseinbruchs beteiligt. In den Pyramidenzellen finden sich die HCN-Kanäle, wie zuvor beschrieben, bevorzugt an den distalen Dendriten und sind hauptsächlich den Typen 1 und 2 zuzuordnen. Wie bereits Zemankovics et al. [93] darstellte, wird ihr Öffnungsverhalten u.a. durch unterschwellige Oszillationen beeinflusst. Er weist darauf hin [93], dass unter Ultraschallbehandlung im Gamma-Frequenzbereich mit einer Zunahme des Spannungseinbruchs zu rechnen ist. Dies führe in letzter Konsequenz auch zu einer Zunahme der Spontanentladungen. Letzteres ist auch in der hier vorliegenden Arbeit nachgewiesen. Diese beschriebene Wirkung des Ultraschalls ist möglicherweise auf die mechanischen Kräfte der Schallwellen zurückzuführen: Durch Schereinwirkung wird das Öffnungs- und Schließverhalten einiger Membrankanäle positiv bzw. negativ beeinflusst. Dies betrifft auch die HCN-Kanäle Typ 1 und 2 an den Dendriten der Pyramidenzellen. Basierend auf diesen physiologisch-anatomischen Grundlagen, lassen sich die Schwankungen des Spannungseinbruchs in den entsprechenden Messprotokollen durch einen variierenden Ionenstrom erklären, der im Endeffekt in einem geänderten Entladungsverhalten der jeweiligen Zellen resultiert. Der in der statistischen Analyse dargestellte Eingangswiderstand steht in engem Zusammenhang mit den beschriebenen elektrophysiologischen Grundlagen. Er scheint maßgeblich durch das Öffnungs- und Schließverhalten dieser Kanäle beeinflusst zu werden. In den hier dargestellten Daten konnte allerdings beim Eingangswiderstand kein signifikanter Unterschied vor zu nach LIFU nachgewiesen werden. Um den genauen Wirkmechanismus des Ultraschalls nachvollziehen zu können, sind demnach weitere systematische Untersuchungen notwendig.

Die bereits zuvor in der Einleitung beschriebenen interneuronalen Oriens-lacunosum-molecular Zellen zeichnen sich durch verschiedene Eigenschaften bezüglich ihres Eingangswiderstandes aus. Daraus resultierend ist ein verändertes Antwortverhalten auf extern und intern applizierte Reize anzunehmen. In FS PTIs (*fast spiking perisomatic region-targeting interneurons*) konnte die Generierung eines Spannungseinbruchs nachgewiesen werden. Allerdings scheint der Strom I_h , der vom Öffnungsverhalten der HCN-Kanäle dieser Zellen abhängt, keinen wesentlichen Einfluss auf den Eingangswiderstand zu haben. Vielmehr zeichnen sie sich durch eine Eigenfrequenz im Gammabereich aus. Diese Oszillationen werden hauptsächlich von spannungsabhängigen Natriumkanälen, die bei einem Membranpotential von mehr als -60 mV öffnen, getragen [93]. Wie Tyler et al. [94] an Maus-Hippocampus-Schnitten nachweisen konnte, erhöht sich durch die Behandlung mit LIFU die Öffnungswahrscheinlichkeit

spannungsabhängiger Natrium- und Calciumkanäle. Auch Min et al. [34] konnte in neurowissenschaftlichen Untersuchungen eine entsprechende Beeinflussung aufzeigen. Die in dieser Arbeit durchgeführte Applikation von Gamma-Frequenzen im Bereich von 50 Hz macht daher eine Beeinflussung von schnell feuernden Interneuronen nach derzeitigem Stand der Forschung sehr wahrscheinlich. Diese scheinen besonders bei geordneten, langsamen Oszillationen während des *upstates* aktiv zu sein und in direktem Austausch zu den Pyramidenzellen zu stehen [107]. Besonders im Bereich des Gamma-Protokolls ist daher von einer verstärkten oszillatorischen Eigenfrequenz einiger Interneuronen auszugehen. Im Fall der FS PTIs ist anzunehmen, dass dies zu einem verstärkten inhibitorischen Input an den Somata der Pyramidenzellen führt. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, kommt es im Rahmen der Temporallappenepilepsien zu einem Ungleichgewicht zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Kräften. Dieses geht u.a. aus einem Untergang an inhibitorischen Zellen an den Dendriten der Pyramidenzellen hervor. Resultierend führt dies zu einem erhöhten exzitatorischen Eingang. Die über einen Feedback-Mechanismus generierte reflektorisch erhöhte Aktivierung verbleibender Interneuronen am Soma der Pyramidenzellen soll das Gleichgewicht aus Exzitation und Inhibition wiederherstellen. Im Rahmen der Temporallappenepilepsien ist dieses jedoch grundlegend zur Exzitation verschoben [36], [43], [104]. Die im Ergebnisteil dargestellten Messergebnisse des Gamma-Protokolls sowie der beschriebene neurophysiologisch-histologische Aufbau führen daher zu der Annahme, dass durch die Applikation von LIFU im Gamma-Frequenzbereich besonders die perisomatische Inhibition an den Somata der Pyramidenzellen verstärkt wird. Diese scheint jedoch nicht auszureichen, um eine signifikante Reduktion der (ungeordneten) Spontanaktivität im Bereich der hippocampalen CA1-Region zu bewirken, da der exzitatorische Eingang an den Dendriten der Pyramidenzellen überwiegt. Eine mögliche Erklärung der im Vergleich zu den Delta-Messungen verminderten Wirkung der Gamma-Oszillationen liefert Lee et al. [7]. Dieser stellt dar, dass eine Wirkung von vermehrten oszillatorischen Entladungen im Gamma-Frequenzbereich besonders die Generierung von Aktionspotentialen in tiefen Pyramidenzellen hemmt. Die oberflächlichen Pyramidenzellen hingegen bleiben weitestgehend unbeeinflusst. Auch Mizuseki et al. [108] beschreibt ein unterschiedliches Ansprechen der Pyramidenzellen auf verschiedene Frequenzbereiche bei oberflächlicher oder tiefer Lage. Eine genauere Darstellung dieses neuroanatomischen Regelkreises findet sich in der Einleitung (vgl. Kapitel 1). Um die Aussage dieser Hypothese genauer zu überprüfen sind jedoch weitere Messungen im Bereich der Gamma-Frequenz mit Unterscheidung der unterschiedlichen Schichtung der Pyramidenzellen notwendig. Dies wurde in der hier vorliegenden Arbeit nicht beachtet.

Im weiteren Verlauf wurden Struktur und Vorkommen der einzelnen Aktionspotentiale genauer untersucht, um eine Aussage über das unterschiedliche Entladungsverhalten nach LIFU treffen zu können. Wie zuvor auch, zeigte sich in der Gamma-Gruppe eine signifikante Zunahme der spontanen Entladungen über die Zeit. In der Einzelanalyse der verschiedenen Gruppen (vgl. Kontrolle, Delta, Gamma) zeigt sich ein weitestgehend stabiles Entladungsverhalten sowohl in der Delta-Gruppe als auch in der Gamma-Gruppe. Der signifikante Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe basiert möglicherweise auf zelleigenen Unterschieden, die sich in einem generell erhöhten Entladungsmuster der Zellen des Gamma-Protokolls äußert. Auffallend ist jedoch der zunehmend abfallende Verlauf der Anzahl der Aktionspotentiale innerhalb der Kontrollgruppe im Vergleich zu vor LIFU. Diese Eigenheit ist ein Hinweis auf eine zunehmende strukturelle Instabilität innerhalb der Zellen, die zu einer erhöhten Membrandurchlässigkeit führen. Dies resultiert im Endeffekt in einer verminderten Fähigkeit, Aktionspotentiale zu generieren.

In engem Zusammenhang mit dieser Hypothese steht auch die Beobachtung der Positivierung des Schwellenpotentials der Kontrollgruppe im Vergleich zu vor LIFU. In der Annahme, dass die Lipiddoppelschicht dieser Zellen über die Zeit löchriger wird, ist anzunehmen, dass vermehrt Kationen in das Innere der Zellen strömen können und diese ihr Gleichgewicht nicht mehr aufrechterhalten können. Im Bereich der Gamma-Gruppe ist anhand der oben aufgeführten Messdaten eine ähnliche Entwicklung des Schwellenpotentials zu beobachten. Allerdings zeigen diese Zellen unter anderem auch im Vergleich zur Kontrollgruppe einen stabilen Verlauf ihres Entladungsverhaltens. Die Positivierung des Schwellenpotentials ist daher möglicherweise auf einen anderen zugrunde liegenden Mechanismus zurückzuführen und geht einher mit wissenschaftlichen Untersuchungen von Bender und Trussell [109]: Durch die erhöhte Entladungsbereitschaft der Zellen der Gamma-Gruppe kommt es wahrscheinlich zu einem physiologischen Anstieg intrazellulärer Kationen. Dadurch wird das Schwellenpotential ebenfalls angehoben.

Abschließend lässt sich schlussfolgern, dass die genaue Wirkung des *low intensity focused ultrasound* in dieser Arbeit nicht vollständig aufgeklärt werden konnte. Allerdings zeigen sich deutliche Hinweise, dass insbesondere Ultraschall mit dem langsamen Repetitionsmuster der Delta-Frequenz einen stabilisierenden Einfluss auf das Zellsystem hat.

7 Zusammenfassung

Mit diesen in vitro Experimenten an Ratten-Hippocampus-Schnitten konnte gezeigt werden, dass die Applikation von LIFU (hier: 480 mW/cm²) variierender Frequenz- und Zeitparameter (vgl. Tabelle 8, Tabelle 9, Tabelle 11) die spontane Aktivität der Pyramidenzellen der hippocampalen CA1-Region maßgeblich beeinflusst. Hierbei ändern sich sowohl die extrazellulären als auch die intrazellulären Parameter signifikant.

Wie in den Kapiteln 1-3 dargestellt, wurde besonders im Bereich der langsamen Delta-Frequenz ein hemmender Effekt auf die Spontanaktivität der Pyramidenzellen der hippocampalen CA1-Region erwartet. Dies kann auch in den hier vorliegenden Messergebnissen bestätigt werden und steht im Einklang mit der derzeit vorherrschenden wissenschaftlichen Ansicht, dass besonders langsame Frequenzen im niedrigen Intensitätsbereich mit einer reversiblen Hemmung der neuronalen Erregbarkeit einhergehen. Im Bereich der Delta-Frequenz konnte sowohl in der Gesamtzahl der spontanen Entladungen in den extrazellulären Messungen als auch in der Einzelauswertung über Einfachentladungen und Mehrfachentladungen eine signifikante Verminderung nachgewiesen werden.

In den Messungen mit applizierter Gamma-Frequenz wurde in Zusammenschau mit der derzeit vorliegenden wissenschaftlichen Datenlage, wonach höhere Frequenzen zu einer Zunahme iktaler Ereignisse sowie ungeordneter Entladungen führen, ein gegensätzlicher Effekt der applizierten Ultraschallfrequenz im niedrigen Intensitätsbereich angenommen. Dies kann in der hier vorliegenden Arbeit jedoch nicht abschließend bestätigt werden. Während eine allgemeine Verminderung der Mehrfachentladungen in der Gamma-Gruppe zu beobachten ist, zeigt sich in der Messgruppe LIFU final Gamma eine Zunahme der spontanen Einfachentladungen bei gleichzeitiger Reduktion der Mehrfachentladungen. Inwieweit dies auf Messungenauigkeiten oder auf das applizierte Frequenzspektrum mit einer Repetitionsrate von 50 Hz zurückzuführen ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend beantwortet werden. Allerdings ist in Zusammenschau mit anderen neurowissenschaftlichen Untersuchungen neben dem stabilisierenden Effekt verschiedener Frequenzspektren auch die mechanische Kraft des Ultraschalls auf das Öffnungs- und Schließungsverhalten einiger Membrantransporter ein wesentlicher Parameter (vgl. auch Kapitel 1-2). Zudem mehrten sich besonders in den hier vorliegenden Daten der intrazellulären Messungen Hinweise, dass im Bereich der Kontrollgruppe mit der Zeit Schädigungen des Zellsystems auftreten. Diese äußern sich in einer zunehmenden Positivierung des Schwellenpotentials sowie einer Abnahme der Akti-

onspotentiale. Auch die Membranzeitkonstante τ zeigt deutliche Unterschiede in ihrem Verhalten über die Zeit und gibt Hinweise auf eine mögliche Instabilität des Zellsystems ohne Ultraschall-Applikation. Um die hier vorgestellten Hypothesen des möglichen Wirkmechanismus von LIFU abschließend beantworten zu können, sind jedoch weitere neurowissenschaftliche Untersuchungen notwendig, bis LIFU als mögliche Therapieoption der medikamentenrefraktären Epilepsien eingesetzt werden kann.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: trisynaptischer Schaltkreis. Die schwarzen Pfeile der Abbildung stellen die charakteristische Verschaltung des trisynaptischen Schaltkreises dar, der in einer 1. Synapse vom entorhinalen Cortex über den tractus perforans zum Gyrus dentatus projiziert. Von hier besteht in einer 2. Synapse über die sog. Moosfasern eine Verbindung zur CA3-Region des hippocampalen Netzwerkes. Die sogenannten Schaffer-Kollateralen projizieren in einer 3. Synapse von der CA3- auf die CA1-Region. Diese baut wiederum rückläufig eine Verbindung zum entorhinalen Cortex auf und schließt dadurch die charakteristische Verschaltung über diesen Regelkreis. Die roten Pfeile stellen vereinfacht weitere wichtige Alternativen in der Verschaltung des Hippocampus dar. Hierzu gehören unter anderem die direkte Verbindung des entorhinalen Cortex zu allen drei CA-Regionen des Hippocampus, die Rückkopplung über das Subiculum zum entorhinalen Cortex, die zusätzliche rückläufige Verbindung von CA3 zu CA2 sowie die Feedback-Verschaltung zwischen CA3 und Gyrus dentatus (Bild aus [3], Fig. 1)..... 11

Abbildung 2: EEG-Beispielspuren verschiedener Frequenzbereiche. Im EEG abgeleitete Wellen können vorrangig fünf Frequenzbereichen zugeordnet werden. Dies sind von oben nach unten: Gamma-, Beta-, Alpha-, Theta und Delta-Wellen. Gamma-Wellen sind häufig im abgeleiteten EEG sehr klein und mit bloßem Auge nicht zu erkennen [20], [32]. In der hier gezeigten Abbildung findet sich daher eine vergrößerte Darstellung. Abbildung in Anlehnung an [33]. 14

Abbildung 3: Übersichtszeichnung des histologischen Aufbaus des Archicortex, dessen größter Anteil vom Hippocampus gebildet wird. Dargestellt ist die neuroanatomisch-histologische Verschaltung zwischen exzitatorischen (schwarz) und inhibitorischen (rot) Zellen im Bereich der hippocampalen CA1-Region. Die Faserschicht des Alveus liegt dem Archicortex des Ammonshorns unmittelbar auf. Sie führt afferente und efferente Fasern des Hippocampus und geht über die Fimbria hippocampi in den Fornix über (nicht dargestellt). Nach innen folgen die drei klassischen Schichten des Archicortex: Stratum oriens als Korbzellschicht (hier dargestellt mit zwei Vertretern dieser Gruppe, den Oriens-lacunosum-moleculare Zellen, sowie den Axo-axonalen Zellen), Stratum pyramidale als Pyramidenzellschicht, mit vor allem großen erregenden glutamatergen Neuronen und das Stratum moleculare, das sich aufteilt in ein Stratum radiatum sowie ein Stratum lacunosum. Das Soma der exzitatorischen Pyramidenzellen ist hauptsächlich im Stratum pyramidale

lokalisiert. Ihre distal apikalen Dendriten reichen bis ins Stratum lacunosum moleculare. Dort werden sie durch die inhibitorische Wirkung von Somatostatin positiven Oriens-lacunosum-moleculare Zellen beeinflusst. Diese haben ihre Zellkörper vorwiegend im Stratum oriens lokalisiert. Die apikalen und basalen Dendriten der hippocampalen Pyramidenzellen der CA1-Region unterstehen dem inhibitorischen Einfluss von Somatostatin positiven Ganglienzellen, deren Zellkörper im Stratum oriens, radiatum oder pyramidale vorzufinden sind. Das Axoninitialsegment der Pyramidenzellen steht in direktem synaptischem Austausch zu Axo-axonalen Zellen. Das Soma selbst sowie die proximalen Dendriten, werden im Bereich des Stratum pyramidale und radiatum durch inhibitorische Einflüsse von parvalbuminpositiven Korbzellen beeinflusst. **KZ**: Korbzellen; **GZ**: Ganglienzellen; **PZ**: Pyramidenzelle; **O-LMZ**: Oriens-lacunosum-moleculare Zellen; **AAZ**: Axo-axonale Zellen. In Anlehnung an [40]. 15

Abbildung 4: Schemazeichnung des Regelkreises zwischen parvalbuminpositiven (PAV+) Korbzellen und oberflächlichen sowie tiefen Pyramidenzellen (PZ). Wie in der Zeichnung durch die variierende Pfeildicke deutlich wird, erhalten die tief gelegenen Pyramidenzellen etwa 3x mehr inhibitorischen Eingang von den PAV+ Korbzellen als die oberflächlichen Pyramidenzellen. Umgekehrt gilt jedoch, dass die Erregung der PAV+ Korbzellen hauptsächlich von den oberflächlichen Pyramidenzellen ausgeht. Deren exzitatorische Synapsen zu den PAV+ Korbzellen sind etwa 3x stärker ausgeprägt als die der tiefen Pyramidenzellen. Demnach resultiert in der hippocampalen CA1-Region eine PAV+ Korbzellen-vermittelte feedforward Inhibition von oberflächlichen Pyramidenzellen zu tiefen Pyramidenzellen. Die Verknüpfungswahrscheinlichkeit sowie die Stärke des durch die PAV+ Korbzellen vermittelten inhibitorischen postsynaptischen Stroms ist unabhängig von der durch die Pyramidenzellen vermittelten Rückprojektion. Es besteht keine Feedback-Inhibition. 20

Abbildung 5: Intramembrane Kavitation. Die Abbildung zeigt die unterschiedlichen Auswirkungen von Ultraschall auf die Lipiddoppelschicht einer Zellmembran sowie des Zytoskeletts. Zu Beginn liegt keine Krafteinwirkung auf die Membran vor. Dies ist der sog. Ausgangszustand (S_0). Bei zunehmender Spannung werden zunächst mechanosensitive Rezeptoren aktiviert (S_1). Steigt die Spannung weiter, führt dies zu Membranschädigungen (S_2) und schließlich zu bleibenden Poren innerhalb der Lipiddoppelschicht (S_{3a} und S_{3b}). (Abbildung aus [62] Fig. 4). 24

- Abbildung 6: Übersichtzeichnung der zur elektrophysiologischen Ableitung verwendeten Messkammer. Diese befand sich auf einem vibrationsgedämpften Tisch innerhalb eines geerdeten Faradaykäfigs. Eine Rollerpumpe gewährleistete während der Lagerung der Schnitte in der Messkammer eine durchgehende Umspülung von mit Carbogen begaster künstlicher Liquorlösung. Ebenfalls mit der Messkammer verbunden war ein Ultraschallwandler, der über den Frequenzgenerator (Master-8) angesteuert wurde. Mittels der Stimulationselektrode (a) wurden die Gewebsschnitte des Hippocampus (d) stimuliert und die so induzierten Signale über die intrazelluläre (b) und extrazelluläre Ableitungselektrode (c) abgeleitet, entsprechend verstärkt und mittels AD-Wandler abgetastet. 41
- Abbildung 7: Ansicht von oben auf den Testaufbau. Dargestellt ist die Intensitätsverteilung des Ultraschalls im Bereich der Messebene. Es zeigt sich von außen nach innen eine deutliche Zunahme der Ultraschallwirkung, dargestellt durch die verschiedenen Farben, wobei „blau – geringste Intensität“ und „rot – stärkste Intensität“ (relative Farbskala) [90]..... 43
- Abbildung 8: Gemessene Ultraschallintensität in Abhängigkeit der eingestellten Ausgangsleistung. Die blauen Punkte markieren die Messdaten, durch die ein quadratischer Fit gelegt wurde (durchgezogene rote Linie). Dieser wurde extrapoliert, um den Wert für 100 % Ausgangsleistung zu bestimmen [90] (Grafik eigenständig überarbeitet)..... 44
- Abbildung 9: Schematische Darstellung des Stimulationsmusters mit einer Repetitionsrate im Delta-Frequenzbereich. Es wird über 30 s alle 2 s ein Ultraschallpuls ($f = 800$ kHz) mit einer Dauer von 1 s appliziert. Insgesamt ergeben sich 15 Repetitionen in 30 s. 45
- Abbildung 10: Schematische Darstellung des Stimulationsmusters mit einer Repetitionsrate im Gamma-Frequenzbereich. Es werden über 1,6 s Ultraschallpulse ($f = 800$ kHz) mit einer Repetitionsrate von 50 Hz appliziert. Insgesamt ergeben sich 80 Repetitionen in 1,6 s..... 45
- Abbildung 11: Zeitlicher Ablauf einer LIFU-Messung. Blau dargestellt ist der Zeitpunkt der Ultraschallapplikation ($f = 800$ kHz). Bei LIFU initial erfolgt diese 2,5 min nach Messbeginn (vgl. oberer Bildabschnitt), bei LIFU final 62,5 min nach Messbeginn (vgl. unterer Bildabschnitt). Grau hinterlegt ist der Zeitbereich zwischen 65 min und 95 min, für den die entsprechenden Messdaten ausgewertet wurden..... 47
- Abbildung 12: Darstellung einer Eingangs-Ausgangs Messung an Ratten-Hippocampus-Schnitten im Bereich der CA1-Region. Die senkrechten grauen Balken markieren den

Zeitpunkt der Stimulation bei $t = 0,10$ s und $t = 0,14$ s. Stimuliert wurde von $0 \mu\text{A}$ bis $30 \mu\text{A}$ in $2,5 \mu\text{A}$ -Schritten, wobei hier aus Gründen der Übersichtlichkeit nur jede zweite Kurve dargestellt ist..... 48

Abbildung 13: Zusammenfassende Darstellung eines Messablaufs der Strom-Spannungs-Sprünge von -1 nA - 1 nA über je 600 ms . Links im Bild ist das Antwortverhalten der Zelle (vgl. oberer Bildabschnitt) in Abhängigkeit von der Stimulation (vgl. unterer Bildabschnitt) über die Zeit dargestellt. Nach 10 Stimulationen erfolgt der Umschlag von hyperpolarisierender Strominjektion zu depolarisierender Strominjektion. Mit zunehmender depolarisierender Strominjektion zeigt sich ein verstärktes Entladungsverhalten der Zelle. In der rechten Bildhälfte sind die gemessenen Spannungskurven übereinander aufgetragen, wobei aus Gründen der Übersichtlichkeit nur jede zweite Kurve dargestellt ist. 51

Abbildung 14: Darstellung einer hyperpolarisierenden Messung. Vor Beginn der Stimulation liegt die Zelle auf dem Ruhemembranpotential. Die bei $0,2 \text{ s}$ einsetzende Stimulation sorgt für einen Einbruch des Potentials, welches einen exponentiellen Abfall mit der Zeitkonstante τ aufweist. Die Differenz zwischen der maximalen Hyperpolarisation und dem sich dann einstellenden Membranpotential wird als "Spannungseinbruch" bezeichnet..... 52

Abbildung 15: Darstellung einer depolarisierenden Messung. Als Reaktion auf die bei $0,2 \text{ s}$ einsetzende Stimulation wird die Zelle depolarisiert und beginnt zu feuern ("Aktionspotentiale"). Nach dem Ende der Stimulation sinkt das Potential wieder auf das Ruhemembranpotential ab, wobei der hierbei auftretende Unterschwinger als Nachhyperpolarisation bezeichnet wird. 52

Abbildung 16: Darstellung einer Aktionspotentialmessung. Wurde eine Zelle über 7 ms mit einer Stimulationsstärke von $1,2 \text{ nA}$ erregt, so reagierte sie ab einem bestimmten Schwellenpotential (vgl. die eingezeichnete gestrichelte Linie) mit der Generierung eines Aktionspotentials (rot dargestellt). 55

Abbildung 17: Beispielspuren für Spontanentladungen. Von oben nach unten: Einfachentladung; Mehrfachentladung; Anfall. Vgl. hierzu auch Tabelle 12. 57

Abbildung 18: Beispielspur der Doppelpulsstimulation. Der Bereich zwischen den gestrichelten Linien markiert jeweils die Amplitude, die roten Linien die minimale Steigung. 58

- Abbildung 19: Bestimmung der Nachhyperpolarisation (AHP). Im unteren Bildabschnitt findet sich eine Darstellung des injizierten Rechteckstroms von 1 nA. Im oberen Bildabschnitt ist die Reaktion der Zelle auf diese maximale Depolarisation dargestellt. Für die Bestimmung der Nachhyperpolarisation wird das Minimum zwischen Cursor 3 und 4 bestimmt und vom Ruhemembranpotential (Minimum zwischen Cursor 1 und 2) abgezogen. 60
- Abbildung 20: Bestimmung des Rauschniveaus einer Messung. Im unteren Bildabschnitt ist eine Strominjektion von 0 nA dargestellt. Im oberen Bildabschnitt zeigt sich die jeweilige Reaktion der Zelle bei fehlender Stimulation. Das Rauschniveau ergibt sich als Differenz zwischen dem Maximum von Cursor 3 und 4 sowie dem Minimum von Cursor 1 und 2. 60
- Abbildung 21: Darstellung der Bestimmung des Spannungseinbruchs (eng. sag). Im unteren Bildabschnitt findet sich eine Darstellung des injizierten Rechteckstroms bei – 1 nA. Im oberen Bildabschnitt ist die Reaktion der Zelle auf diese maximale Hyperpolarisation dargestellt. Durch die Bestimmung des Minimums zwischen Cursor 1 und 2 konnte die Stärke des Spannungseinbruchs bestimmt werden. Als Bezugspunkt wurde das Maximum zwischen Cursor 3 und 4 genommen (maximale Hyperpolarisation ohne ‚Senke‘)..... 61
- Abbildung 22: Beispielspuren der extrazellulären Spontanentladungen. Die jeweiligen Hirnschnitte wurden entweder 2,5 min nach Messbeginn einer Ultraschallapplikation von 800 kHz und einer Repetitionsrate im Delta- oder Gamma-Frequenzbereich ausgesetzt (vgl. hierzu die Bildabschnitte LIFU initial Delta und LIFU initial Gamma) oder gegen Ende einer Messung nach 62,5 min. Zu diesem Zeitpunkt waren die jeweiligen Gewebsschnitte bereits spontan aktiv (vgl. hierzu die Bildabschnitte LIFU final Delta sowie LIFU final Gamma).... 65
- Abbildung 23: Zusammenfassende Darstellung der Spontanentladungen / 30 s. In der Kontrollgruppe zeigen sich im Median etwa 20 Entladungen / 30 s, während in den ultraschallbehandelten Gruppen eine signifikante Verminderung ($p \leq 0,05$) dieser spontanen Entladungen im Vergleich zur Kontrollgruppe zu beobachten ist. Kontrolle n = 13, LIFU initial Delta n = 10, LIFU final Delta n = 14, LIFU initial Gamma n = 13, LIFU final Gamma n = 25. \top oberer Whisker; \perp unterer Whisker; — Median. Signifikanzen sind mit einem * gekennzeichnet. 66
- Abbildung 24: Zusammenfassende Darstellung der Einfachentladungen / 30 s. Es zeigt sich in allen ultraschallbehandelten Messgruppen eine signifikante Änderung im Vergleich zur Kontrollgruppe, wobei $p \leq 0,05$. Kontrolle n = 13, LIFU initial Delta n = 10, LIFU final Delta

n = 14, LIFU initial Gamma n = 13, LIFU final Gamma n = 25. \top oberer Whisker; \perp unterer Whisker; — Median. Signifikanzen sind mit einem * gekennzeichnet. 67

Abbildung 25: Graphische Darstellung der Mehrfachentladungen / 30 s. Es zeigt sich in allen ultraschallbehandelten Messgruppen eine signifikante Änderung im Vergleich zur Kontrollgruppe, wobei $p \leq 0,05$. Kontrolle n = 13, LIFU initial Delta n = 10, LIFU final Delta n = 14, LIFU initial Gamma n = 13, LIFU final Gamma n = 25. \top oberer Whisker; \perp unterer Whisker; — Median. Signifikanzen sind mit einem * gekennzeichnet. 68

Abbildung 26: Darstellung des Doppelpulsverhältnis‘ der Amplitude vor und nach Ultraschallbehandlung. Vor LIFU bezeichnet hierbei die Gruppe an Gewebsschnitten vor einer Ultraschall-Applikation mit 800 kHz und einer Repetitionsrate im Delta- bzw. Gamma-Frequenzbereich. Diese Werte wurden in ihrem Mittelwert auf 100 normiert. Nach erfolgter Ultraschallbehandlung (vgl. Nach LIFU) wurden die entsprechenden Messwerte hierzu ins Verhältnis gesetzt. Kontrolle (n = 9), Delta (n = 5), Gamma (n = 7). Im Wilcoxon-Test zeigt sich keine signifikante Änderung des PPR in den jeweiligen Messprotokollen, wobei $p \leq 0,05$ 70

Abbildung 27: Darstellung des Doppelpulsverhältnis‘ der Amplitude über die Stimulationsstärke. Auch wenn sich das Doppelpulsverhältnis mit der Stimulationsstärke ändert, zeigt sich im Wilcoxon-Test kein signifikanter Unterschied nach Ultraschall-Applikation. **A** Kontrolle (n = 9), **B** Delta (n = 5), **C** Gamma (n = 7). 71

Abbildung 28: Darstellung des Doppelpulsverhältnis‘ der Steigung vor und nach Ultraschallbehandlung. Vor LIFU bezeichnet hierbei die Gruppe an Gewebsschnitten vor einer Ultraschall-Applikation mit 800 kHz und einer Repetitionsrate im Delta- bzw. Gamma-Frequenzbereich. Diese Werte wurden in ihrem Mittelwert auf 100 normiert. Nach erfolgter Ultraschallbehandlung (vgl. nach LIFU) wurden die entsprechenden Messwerte hierzu ins Verhältnis gesetzt. Kontrolle (n = 9), Delta (n = 5), Gamma (n = 7). Im Wilcoxon-Test zeigt sich keine signifikante Änderung des PPR in den jeweiligen Messprotokollen, wobei $p \leq 0,05$ 72

Abbildung 29: Darstellung des Doppelpulsverhältnis‘ der Steigung über die Stimulationsstärke. Es zeigen sich keine signifikanten Änderungen des Doppelpulsverhältnis‘ in Abhängigkeit von der Stimulationsstärke. Dies wird auch im Wilcoxon-Test bestätigt, wobei $p \leq 0,05$. **A** Kontrolle (n = 9), **B** Delta (n = 5), **C**

Gamma (n = 7).	73
----------------------	----

Abbildung 30: Darstellung der Strom-Spannungs-Linien. Dargestellt ist der lineare Zusammenhang der Potentialdifferenz der Zelle (mV) in Abhängigkeit von der injizierten Stromstärke (nA). Links oben im Bild finden sich ausgewählte farbige Beispielspuren, wobei der für die Auswertung relevante Messbereich grau hinterlegt ist. In den sich anschließenden Strom-Spannungs-Kennlinien (vor LIFU, nach 0 Minuten, nach 5 Minuten, nach 10 Minuten, nach 15 Minuten) findet sich eine vergleichende Darstellung der Änderung der Potentialdifferenz über die Zeit nach Ultraschallapplikation. Es ergibt sich ein linearer Zusammenhang, der in der Regressionsanalyse bestätigt wird. Als Referenzgruppe diene jeweils die Kontrolle der gleichen Zeitebene. Wie in der Abbildung deutlich wird, zeigen sich unabhängig von der Ultraschallbehandlung der Zellgruppen, keine signifikanten Änderungen der Potentialdifferenz. Dies bestätigt sich auch im U-Test nach Mann-Whitney ($p \leq 0,05$). Kontrolle n = 10; Delta n = 6, Gamma n = 6. 75

Abbildung 31: Darstellung des Eingangswiderstands in $M\Omega$. Links oben im Bild finden sich repräsentativ ausgewählte farbige Strom-Spannungs-Kennlinien und die zugehörigen Geraden der linearen Regression. In den sich anschließenden Balkendiagrammen (vor LIFU, nach 0 Minuten, nach 5 Minuten, nach 10 Minuten, nach 15 Minuten) findet sich eine vergleichende Darstellung der Änderung des Eingangswiderstands über die Zeit nach Ultraschallapplikation. Als Referenzgruppe diene jeweils die Kontrolle der gleichen Zeitebene. Wie in der Abbildung deutlich wird, zeigen sich keine signifikanten Änderungen 0 min nach LIFU, 5 min nach LIFU, 10 min nach LIFU und 15 min nach LIFU in der Delta- bzw. Gamma-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Kontrolle n = 10; Delta n = 6, Gamma n = 6. 77

Abbildung 32: Darstellung des Eingangswiderstands ($M\Omega$) über die Zeit. Von links nach rechts: Kontrolle, Delta, Gamma. Als Referenzgruppe diene die jeweilige Zellpopulation eines Messprotokolls vor LIFU. Wie in der Abbildung gezeigt, ergeben sich auch innerhalb der jeweiligen Stimulationsprotokolle (Kontrolle, Delta, Gamma) im Wilcoxon-Test keine signifikanten Änderungen des Eingangswiderstands ($M\Omega$) im Vergleich zu der Zellpopulation vor LIFU. Wie durch die grau eingezeichnete Linie in der Abbildung verdeutlicht, liegen sämtliche Änderungen des Eingangswiderstands ($M\Omega$) innerhalb des Fehlerbalkens von vor LIFU. Kontrolle n = 10; Delta n = 6, Gamma n = 6. 79

Abbildung 33: Darstellung der Zeitkonstante τ über die Zeit. Links oben im Bild finden sich repräsentativ ausgewählte farbige Beispielspuren für verschiedene Stimulationsströme, wobei der für die Auswertung relevante Messbereich grau hinterlegt ist. In den sich anschließenden Balkendiagrammen (vor LIFU, nach 0 Minuten, nach 5 Minuten, nach 10 Minuten, nach 15 Minuten) findet sich eine Darstellung der Änderung der Zeitkonstante τ über die Zeit nach Ultraschallapplikation. Als Referenzgruppe diene jeweils die Kontrolle der gleichen Zeitebene. Wie in der Abbildung deutlich wird, bestehen bereits vor LIFU im U-Test nach Mann-Whitney signifikante Schwankungen innerhalb der Gruppen. Kontrolle n = 10; Delta n = 6, Gamma n = 6. Signifikanzen ($p \leq 0,05$) sind mit einem * gekennzeichnet. 80

Abbildung 34: Darstellung der Zeitkonstante τ (ms) über die Zeit. Von links nach rechts: Kontrolle, Delta, Gamma. Als Referenzgruppe diene die jeweilige Zellpopulation eines Messprotokolls vor LIFU. Wie in der Abbildung gezeigt ergeben sich innerhalb der verschiedenen Stimulationsgruppen signifikante Unterschiede im Wilcoxon-Test bezüglich der Zeitkonstante τ über die Zeit. Diese sind in der obigen Abbildung mit einem * gekennzeichnet und liegen außerhalb des grau eingezeichneten Fehlerbalkens der Daten vor LIFU. Kontrolle n = 10; Delta n = 6, Gamma n = 6. Signifikanzen ($p \leq 0,05$) sind mit einem * gekennzeichnet. 82

Abbildung 35: Darstellung des Betrages der Nachhyperpolarisation (mV). Links oben im Bild finden sich ausgewählte farbige Beispielspuren, wobei der für die Auswertung relevante Messbereich grau hinterlegt ist. In den sich anschließenden Grafiken (vor LIFU, nach 0 Minuten, nach 5 Minuten, nach 10 Minuten, nach 15 Minuten) findet sich eine Darstellung der Änderung der Nachhyperpolarisation über die Zeit nach Ultraschallapplikation. Als Referenzgruppe diene jeweils die Kontrolle der gleichen Zeitebene. Signifikante Änderungen ergaben sich hierbei nur für das Delta-Protokoll nach 0 resp. 5 Minuten. Kontrolle n = 10; Delta n = 6, Gamma n = 6. Signifikanzen ($p \leq 0,05$) sind mit einem * gekennzeichnet. 84

Abbildung 36: Darstellung der Nachhyperpolarisation (mV) über die Zeit. Von links nach rechts: Kontrolle, Delta, Gamma. Als Referenzgruppe diene die jeweilige Zellpopulation eines Messprotokolls vor LIFU. Wie in der Abbildung deutlich wird, zeigen sowohl die Zellen der Kontrollgruppe, als auch des Delta- und Gamma-Protokolls deutliche Schwankungen ihrer Nachhyperpolarisation (mV). Diese stellen sich in den beiden zuerst genannten Protokollen im Wilcoxon-Test zum Teil auch signifikant dar, wobei ihr Wertebereich dabei auch bisweilen innerhalb des grau eingezeichneten Fehlerbalkens der entsprechenden Daten

vor LIFU liegt. Kontrolle n = 10; Delta n = 6, Gamma n = 6. Signifikanzen sind mit einem * gekennzeichnet. 86

Abbildung 37: Darstellung des Spannungseinbruchs (mV) über die Zeit. Links oben im Bild finden sich ausgewählte farbige Beispielspuren, wobei der für die Auswertung relevante Messbereich grau hinterlegt ist. In den sich anschließenden Grafiken (vor LIFU, nach 0 Minuten, nach 5 Minuten, nach 10 Minuten, nach 15 Minuten) findet sich eine Darstellung der Änderung des Spannungseinbruchs über die Zeit nach Ultraschallapplikation. Als Referenzgruppe diente jeweils die Kontrolle der gleichen Zeitebene. Kontrolle n = 10; Delta n = 6, Gamma n = 6. Signifikanzen ($p \leq 0,05$) sind mit einem * gekennzeichnet. 88

Abbildung 38: Darstellung des Spannungseinbruchs (mV) über die Zeit. Von links nach rechts: Kontrolle, Delta, Gamma. Als Referenzgruppe diente die jeweilige Zellpopulation eines Messprotokolls vor LIFU. Wie in der Abbildung dargestellt, zeigt sich besonders in der Zellpopulation der Kontrollmessung sowie der Deltamessung eine signifikante Abnahme des Spannungseinbruchs über die Zeit. Diese Unterschiede zu der Zellpopulation vor LIFU werden auch im Wilcoxon-Test bestätigt. Die grau hinterlegten Linien in der obigen Abbildung verdeutlichen, dass die Signifikanzen, mit Ausnahme der Gamma-Gruppe, außerhalb des angegebenen Fehlerbalkens der Messdaten vor LIFU liegen. Kontrolle n = 10; Delta n = 6, Gamma n = 6. Signifikanzen ($p \leq 0,05$) sind mit einem * gekennzeichnet. 90

Abbildung 39: Darstellung des Entladungsverhaltens der Zellen über die Zeit. Links oben im Bild finden sich ausgewählte farbige Beispielspuren. In den sich anschließenden Grafiken (vor LIFU, nach 0 Minuten, nach 5 Minuten, nach 10 Minuten, nach 15 Minuten) findet sich eine Darstellung der Änderung des Entladungsverhaltens der verschiedenen Zellpopulationen über die Zeit nach Ultraschallapplikation. Als Referenzgruppe diente jeweils die Kontrolle der gleichen Zeitebene. Wie in der Abbildung dargestellt, zeigen die Kontrolle sowie die Delta-Gruppe kaum Änderungen in ihrem Entladungsverhalten über die Zeit. Im Vergleich hierzu zeigen sich deutliche Unterschiede bei den mit einer Repetitionsrate im Bereich der Gamma-Frequenz behandelten Zellen. Hier besteht bereits vor LIFU ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe, der sich in einer erhöhten Rate an Aktionspotentialen in der Gamma-Gruppe äußert. Kontrolle n = 10; Delta n = 6, Gamma n = 6. Signifikanzen ($p \leq 0,05$) sind mit einem * gekennzeichnet. 92

Abbildung 40: Darstellung des Entladungsverhaltens der Zellen über die Zeit. Von links nach

rechts: Kontrolle, Delta, Gamma. Als Referenzgruppe diente die jeweilige Zellpopulation eines Messprotokolls vor LIFU. Es zeigt sich eine signifikante Verminderung der Anzahl der Aktionspotentiale über die Zeit in der Kontrollgruppe im Vergleich zu vor LIFU. Auch in der Gruppe des Delta-Protokolls zeigt sich eine deutliche Abnahme des Entladungsverhaltens nach LIFU, wobei die angegebenen Änderungen innerhalb des Fehlerbalkens liegen. Im Bereich der Gamma-Gruppe zeigt sich eine signifikante Zunahme an Entladungen über die Zeit im Vergleich zu derselben Zellgruppe vor LIFU, wobei der Maximalwert 15 min nach LIFU erreicht wird. Kontrolle n = 10; Delta n = 6, Gamma n = 6. Signifikanzen ($p \leq 0,05$) sind mit einem * gekennzeichnet. 94

Abbildung 41: Anzahl der spontanen Einzelentladungen über die Stimulation. Wie in der Abbildung dargestellt, unterscheiden sich die einzelnen Stimulationsgruppen in ihrer Entladungshäufigkeit sowie in ihrem Entladungsbeginn. Während die Kontroll- und die Deltagruppe in Bezug auf Entladungsbeginn und -häufigkeit ein ähnliches Verhalten aufweisen, tritt in der Gamma-Gruppe eine frühere und häufigere Entladung auf, was sich auch im Mann-Whitney-Test widerspiegelt. Kontrolle n = 10; Delta n = 6, Gamma n = 6. Signifikanzen ($p \leq 0,05$) sind mit einem * gekennzeichnet. 95

Abbildung 42: Darstellung der Entladungsneigung der einzelnen Messprotokolle über die Zeit. Wie in der Abbildung deutlich wird, zeigt die Kontrollgruppe eine signifikante Abnahme ihrer Aktionspotentiale über die Zeit. Das Verhalten der mit einer Repetitionsrate im Delta- und Gamma-Bereich behandelten Zellen zeigt sich weitestgehend stabil. Kontrolle n = 10; Delta n = 6, Gamma n = 6. Signifikanzen ($p \leq 0,05$) sind mit einem * gekennzeichnet. 97

Abbildung 43: Darstellung des Betrages des Schwellenpotentials über die Zeit. Vor der Ultraschall-Applikation liegen die Schwellenpotentiale übereinstimmend bei rund 60 mV. Nach der Ultraschall-Applikation sinken die Schwellenpotentiale in der Kontroll- und Gamma-Gruppe ab, während die der Delta-Gruppe konstant bleiben. Kontrolle n = 10; Delta n = 6, Gamma n = 6. Signifikanzen ($p \leq 0,05$) sind mit einem * gekennzeichnet. 98

Abbildung 44: Darstellung des Betrages des Schwellenpotentials über die Zeit (mV). Innerhalb der verschiedenen Messgruppen zeigt sich ein unterschiedliches Verhalten der Zellen (vgl. Kontrolle, Delta, Gamma) bezüglich ihres Schwellenpotentials über die Zeit. Während in der Kontrolle sowie der Gamma-Gruppe eine Abnahme des Schwellenpotentials über die Zeit zu beobachten ist, zeigen sich die Daten der Delta-Gruppe in ihrem Verlauf über

die Zeit stabil. Kontrolle n = 10; Delta n = 6, Gamma n = 6. Signifikanzen ($p \leq 0,05$) sind mit einem * gekennzeichnet.	99
--	----

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Schlafstadien nach Rechtschaffen und REM-Schlaf	26
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien	34
Tabelle 3: Auflistung des verwendeten Ein- und Mehrwegmaterials	35
Tabelle 4: Für die Messung verwendete Geräte	36
Tabelle 5: Künstliche Liquorlösung	38
Tabelle 6: Künstliche Liquorlösung ohne Magnesium	39
Tabelle 7: Saccharoselösung (Präparationslösung)	39
Tabelle 8: Messübersicht der Spontanaktivität	46
Tabelle 9: Messübersicht der Eingangs-Ausgangs Messungen	49
Tabelle 10: Übersicht der passiven elektrotonischen und aktiven Membraneigenschaften	53
Tabelle 11: Messübersicht der intrazellulären Strom-Spannungs-Sprünge- und Spike Messungen	54
Tabelle 12: Definition extrazellulärer Messparameter	57
Tabelle 13: R^2 der Strom-Spannungs-Linien	76
Tabelle 14: Eingangswiderstand ($M\Omega$) der untersuchten Zellpopulationen	76
Tabelle 15: p-Werte des Mann-Whitney-Tests des Eingangswiderstands im Vergleich zur Kontrollgruppe	78
Tabelle 16: Darstellung der p-Werte des Wilcoxon-Tests für den Eingangswiderstand im Vergleich zur selben Stimulationsgruppe vor LIFU	79
Tabelle 17: Darstellung der p-Werte des U-Tests nach Mann-Whitney für die Zeitkonstante τ im Vergleich zur Kontrollgruppe	81
Tabelle 18: Darstellung der p-Werte des Wilcoxon-Tests für die Zeitkonstante im Vergleich	

zur selben Stimulationsgruppe vor LIFU	82
Tabelle 19: Darstellung der p-Werte des U-Test nach Mann-Whitney für die Nachhyperpolarisation (mV) im Vergleich zur Kontrollgruppe.....	85
Tabelle 20: Darstellung der p-Werte des Wilcoxon-Tests für die Nachhyperpolarisation (mV) im Vergleich zur selben Stimulationsgruppe vor LIFU.....	87
Tabelle 21: Darstellung der p-Werte des U-Tests nach Mann-Whitney für den Spannungseinbruch (mV) im Vergleich zur Kontrolle	89
Tabelle 22: Darstellung der p-Werte des Wilcoxon-Tests für den Spannungseinbruch (mV) im Vergleich zu vor LIFU.....	91
Tabelle 23: Darstellung der p-Werte des U-Test nach Mann-Whitney für das Entladungsverhalten im Vergleich zur Kontrolle	93
Tabelle 24: Darstellung der p-Werte des Wilcoxon-Tests für das Entladungsverhalten im Vergleich zu vor LIFU.....	94
Tabelle 25: p-Werte des U-Tests nach Mann-Whitney für die Anzahl der Aktionspotentiale. Als Vergleichsgruppe fungierte hierbei die Kontrollgruppe.	96
Tabelle 26: p-Werte des U-Tests nach Mann-Whitney für die Anzahl der Aktionspotentiale. Als Vergleichsgruppe fungierte hierbei die jeweilige Messung vor Ultraschall-Applikation..	97
Tabelle 27: p-Werte des U-Tests nach Mann-Whitney für die Schwellenpotentiale (mV). Als Vergleichsgruppe fungierte hierbei die Kontrollgruppe zu den jeweiligen Zeitpunkten.	99
Tabelle 28: p-Werte des U-Tests nach Mann-Whitney für die Schwellwertpotentiale. Als Vergleichsgruppe fungierte hierbei die jeweilige Messung vor Ultraschall-Applikation.	100

Literaturverzeichnis

- [1] M. Trepel und K. Dalkowski, „Neuroanatomie: Struktur und Funktion“. Urban & Fischer Verlag GmbH & Co. KG, Philadelphia, Jan. 01, 2012.
- [2] R. A. Sandler, D. Song, R. E. Hampson, S. A. Deadwyler, T. W. Berger, und V. Z. Marmarelis, „Hippocampal closed-loop modeling and implications for seizure stimulation design“, *Journal of neural engineering*, Bd. 12, Nr. 5. S. 056017, Jan. 01, 2015. doi: 10.1088/1741-2560/12/5/056017.
- [3] C. Wang, M. A. Grohme, B. Mali, R. O. Schill, und M. Frohme, „Towards decrypting cryptobiosis--analyzing anhydrobiosis in the tardigrade *Milnesium tardigradum* using transcriptome sequencing“, *PloS one*, Bd. 9, Nr. 3. S. 92663, Jan. 01, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0092663.
- [4] T. T. G. Hahn, B. Sakmann, und M. R. Mehta, „Differential responses of hippocampal subfields to cortical up–down states“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 104, Nr. 12, S. 5169–5174, März 2007, doi: 10.1073/pnas.0700222104.
- [5] C. Varga, S. Y. Lee, und I. Soltesz, „Target-selective GABAergic control of entorhinal cortex output“, *Nature neuroscience*, Bd. 13, Nr. 7. S. 822–4, Jan. 01, 2010. doi: 10.1038/nn.2570.
- [6] Mark O. Cunningham, „Gamma Oscillations Induced by Kainate Receptor Activation in the Entorhinal Cortex In Vitro“.
- [7] S.-H. Lee u. a., „Parvalbumin-positive basket cells differentiate among hippocampal pyramidal cells“, *Neuron*, Bd. 82, Nr. 5. S. 1129–44, Jan. 01, 2014. doi: 10.1016/j.neuron.2014.03.034.
- [8] H. Hakimova, S. Kim, K. Chu, S. K. Lee, B. Jeong, und D. Jeon, „Ultrasound stimulation inhibits recurrent seizures and improves behavioral outcome in an experimental model of mesial temporal lobe epilepsy“, *Epilepsy & behavior : E&B*, Bd. 49. S. 26–32, Jan. 01, 2015. doi: 10.1016/j.yebeh.2015.04.008.
- [9] H. Steinmetz und M. Sitzer, „Lehrbuch Neurologie“. Urban & Fischer, Munich, Germany, Jan. 01, 2011. [Online]. Verfügbar unter: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&AN=807979>
- [10] S. Joshi, K. Rajasekaran, und J. Kapur, „GABAergic Transmission in Temporal Lobe Epilepsy: the Role of Neurosteroids“, *Exp. Neurol.*, Bd. 244, S. 36–42, Juni 2013, doi: 10.1016/j.expneurol.2011.10.028.
- [11] H. F. J. González u. a., „Thalamic arousal network disturbances in temporal lobe epilepsy and improvement after surgery“, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, Bd. 90, Nr. 10, S. 1109–1116, Okt. 2019, doi: 10.1136/jnnp-2019-320748.
- [12] W. B. Scoville und B. Milner, „LOSS OF RECENT MEMORY AFTER BILATERAL HIPPOCAMPAL LESIONS“, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, Bd. 20, Nr. 1, S. 11–21, Feb. 1957.
- [13] W. J. Tyler, „Noninvasive neuromodulation with ultrasound? A continuum mechanics hypothesis“, *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, Bd. 17, Nr. 1. S. 25–36, Jan. 01, 2011. doi: 10.1177/1073858409348066.
- [14] C. E. Santana-Gómez u. a., „Transcranial focal electrical stimulation reduces the convulsive expression and amino acid release in the hippocampus during pilocarpine-induced status epilepticus in rats“, *Epilepsy & behavior : E&B*, Bd. 49. S. 33–9, Jan. 01, 2015. doi: 10.1016/j.yebeh.2015.04.037.
- [15] A. Bystritsky u. a., „A review of low-intensity focused ultrasound pulsation“, *Brain stimulation*, Bd. 4, Nr. 3. S. 125–36, Jan. 01, 2011. doi: 10.1016/j.brs.2011.03.007.

- [16] P. S. Yang u. a., „Transcranial focused ultrasound to the thalamus is associated with reduced extracellular GABA levels in rats“, *Neuropsychobiology*, Bd. 65, Nr. 3. S. 153–60, Jan. 01, 2012. doi: 10.1159/000336001.
- [17] D. P. Darrow, „Focused Ultrasound for Neuromodulation“, *Neurotherapeutics*, Bd. 16, Nr. 1, S. 88–99, Jan. 2019, doi: 10.1007/s13311-018-00691-3.
- [18] J. A. N. Fisher und I. Gumenchuk, „Low-intensity focused ultrasound alters the latency and spatial patterns of sensory-evoked cortical responses *in vivo*“, *J. Neural Eng.*, Bd. 15, Nr. 3, S. 035004, Juni 2018, doi: 10.1088/1741-2552/aaee1.
- [19] P. S. Fishman und V. Frenkel, „Focused Ultrasound: An Emerging Therapeutic Modality for Neurologic Disease“, *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics*, Bd. 14, Nr. 2. S. 393–404, Jan. 01, 2017. doi: 10.1007/s13311-017-0515-1.
- [20] R. F. Schmidt, F. Lang, und M. Heckmann, „Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie“. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, Jan. 01, 2011. doi: 10.1007/978-3-642-01651-6.
- [21] R. E. Burke, „Sir Charles Sherrington’s The integrative action of the nervous system: a centenary appreciation“, *Brain*, Bd. 130, Nr. 4, S. 887–894, Apr. 2007, doi: 10.1093/brain/awm022.
- [22] R. T. Canolty u. a., „Oscillatory phase coupling coordinates anatomically dispersed functional cell assemblies“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Bd. 107, Nr. 40. S. 17356–61, Jan. 01, 2010. doi: 10.1073/pnas.1008306107.
- [23] Catherine Tallon-Baudry, Olivier Bertrand, Franck Peronnet, and Jacques Pernier, „Induced α -Band Activity during the Delay of a Visual Short-Term Memory Task in Humans“.
- [24] D. O. Hebb, *The Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory*, New Ed. Mahwah, N.J.: Taylor & Francis Inc, 2002.
- [25] S. J. Cooper, „Donald O. Hebb’s synapse and learning rule: a history and commentary“, *Neuroscience and biobehavioral reviews*, Bd. 28, Nr. 8. S. 851–74, Jan. 01, 2005. doi: 10.1016/j.neubiorev.2004.09.009.
- [26] André Fisahn, „Cholinergic induction of network oscillations at 40 Hz in the hippocampus *in vitro*“.
- [27] G. T. Neske, „The Slow Oscillation in Cortical and Thalamic Networks: Mechanisms and Functions“, *Frontiers in neural circuits*, Bd. 9. S. 88, Jan. 01, 2015. doi: 10.3389/fncir.2015.00088.
- [28] M. Steriade, A. Nuñez, and F. Amzica, „A Novel Slow Oscillation of Neocortical Neurons *in vivo*“.
- [29] C. Varga, P. Golshani, und I. Soltesz, „Frequency-invariant temporal ordering of inter-neuronal discharges during hippocampal oscillations in awake mice“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Bd. 109, Nr. 40. S. 2726–34, Jan. 01, 2012. doi: 10.1073/pnas.1210929109.
- [30] Astrid von Stein, Johannes Sarnthein, „Different frequencies for different scales of cortical integration: from local gamma to long range alpha \rightarrow theta synchronization“.
- [31] J. Matias Palva and Satu Palva, „Functional integration across oscillation frequencies by cross - frequency phase synchronization “.
- [32] K. Aboalayon, M. Faezipour, W. Almuhammadi, und S. Moslehpour, „Sleep Stage Classification Using EEG Signal Analysis: A Comprehensive Survey and New Investigation“, *Entropy*, Bd. 18, Aug. 2016, doi: 10.3390/e18090272.
- [33] „Greek Alphabet Soup – Making Sense of EEG Bands“. <http://neuro-sky.com/2015/05/greek-alphabet-soup-making-sense-of-eeb-bands/> (zugegriffen Mai

- 23, 2020).
- [34] B.-K. Min u. a., „Focused ultrasound-mediated suppression of chemically-induced acute epileptic EEG activity“, *BMC Neurosci.*, Bd. 12, Nr. 1, S. 23, März 2011, doi: 10.1186/1471-2202-12-23.
 - [35] Jokūbas Žiburkus, John R. Cressman, and Steven J. Schiff, „Seizures as imbalanced up states: excitatory and inhibitory con“.
 - [36] D. W. Grasse, S. Karunakaran, and K. A. Moxon, „Neuronal synchrony and the transition to spontaneous seizures“, *Experimental neurology*, Bd. 248. S. 72–84, Jan. 01, 2013. doi: 10.1016/j.expneurol.2013.05.004.
 - [37] G. M. Ibrahim u. a., „Neocortical pathological high-frequency oscillations are associated with frequency-dependent alterations in functional network topology“, *Journal of neurophysiology*, Bd. 110, Nr. 10. S. 2475–83, Jan. 01, 2013. doi: 10.1152/jn.00034.2013.
 - [38] S. Seo und B. Leitch, „Synaptic changes in GABAA receptor expression in the thalamus of the stargazer mouse model of absence epilepsy“, *Neuroscience*, Bd. 306. S. 28–38, Jan. 01, 2015. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.08.021.
 - [39] M. R. Karlócai u. a., „Physiological sharp wave-ripples and interictal events in vitro: what’s the difference?“, *Brain*, Bd. 137, Nr. 2, S. 463–485, Feb. 2014, doi: 10.1093/brain/awt348.
 - [40] C. Hammond, „Cellular and molecular neurophysiology“. Elsevier/AP, Amsterdam, Jan. 01, 2015. doi: 10.1016/B978-0-12-397032-9.00019-4.
 - [41] J. Szabadics, C. Varga, G. Molnár, S. Oláh, P. Barzó, und G. Tamás, „Excitatory effect of GABAergic axo-axonic cells in cortical microcircuits“, *Science (New York, N.Y.)*, Bd. 311, Nr. 5758. S. 233–5, Jan. 01, 2006. doi: 10.1126/science.1121325.
 - [42] M. Megias, ZS. Emri, T. F. Freund, A. I. Gulyás, „TOTAL NUMBER AND DISTRIBUTION OF INHIBITORY AND EXCITATORY SYNAPSES ON HIPPOCAMPAL CA1 PYRAMIDAL CELLS“.
 - [43] R. Cossart, „Dendritic but not somatic GABAergic inhibition is decreased in experimental epilepsy“.
 - [44] Z. Nusser, N. Hájos, P. Somogyi, und I. Mody, „Increased number of synaptic GABAA receptors underlies potentiation at hippocampal inhibitory synapses“, *Nature*, Bd. 395, Nr. 6698, S. 172–177, Sep. 1998, doi: 10.1038/25999.
 - [45] K. Aktories, U. Förstermann, F. B. Hofmann, und K. Starke, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Begründet von W. Forth, D. Henschler, W. Rummel - mit Zugang zum Elsevier-Portal*, 11. Aufl. München: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 2013.
 - [46] M. T. Bianchi, K. F. Haas, und R. L. Macdonald, „Structural Determinants of Fast Desensitization and Desensitization–Deactivation Coupling in GABAARceptors“, *J. Neurosci.*, Bd. 21, Nr. 4, S. 1127–1136, Feb. 2001, doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-04-01127.2001.
 - [47] I. Mody und R. A. Pearce, „Diversity of inhibitory neurotransmission through GABAA receptors“, *Trends Neurosci.*, Bd. 27, Nr. 9, S. 569–575, Sep. 2004, doi: 10.1016/j.tins.2004.07.002.
 - [48] Y. Ben-Ari, „Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture“, *Nat. Rev. Neurosci.*, Bd. 3, Nr. 9, Art. Nr. 9, Sep. 2002, doi: 10.1038/nrn920.
 - [49] P. Poisbeau, M. C. Cheney, M. D. Browning, und I. Mody, „Modulation of Synaptic GABAA Receptor Function by PKA and PKC in Adult Hippocampal Neurons“, *J. Neurosci.*, Bd. 19, Nr. 2, S. 674–683, Jan. 1999, doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-02-00674.1999.
 - [50] E. Rezayat und I. Ghodrati Toostani, „Review Paper: A Review on Brain Stimulation

- Using Low Intensity Focused Ultrasound“, *Basic Clin. Neurosci. J.*, Bd. 7, Nr. 3, 2016, doi: 10.15412/J.BCN.03070303.
- [51] W. Demtröder, „Mechanische Schwingungen und Wellen“, *Experimentalphysik*. Springer Spektrum, Berlin; Heidelberg, S. 327–386, Jan. 01, 2015. doi: 10.1007/978-3-662-46415-1_11.
- [52] W. D. O’Brien, „Ultrasound–biophysics mechanisms“, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, Bd. 93, Nr. 1–3, S. 212–255, Jan. 2007, doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2006.07.010.
- [53] Y. Tufail u. a., „Transcranial pulsed ultrasound stimulates intact brain circuits“, *Neuron*, Bd. 66, Nr. 5, S. 681–94, Jan. 01, 2010. doi: 10.1016/j.neuron.2010.05.008.
- [54] „Ultraschallanwendung am Menschen - Empfehlung der Strahlenschutzkommission“. Apr. 20, 2012. Zugegriffen: Mai 10, 2020. [Online]. Verfügbar unter: https://www.greenbirth.de/images/_256._Sitzung_SSK_19.20._April_2012.pdf
- [55] William D. O’Brien Jr.* , „Ultrasound—biophysics mechanisms†“.
- [56] W. Legon, A. Rowlands, A. Opitz, T. F. Sato, und W. J. Tyler, „Pulsed Ultrasound Differentially Stimulates Somatosensory Circuits in Humans as Indicated by EEG and fMRI“, *PLOS ONE*, Bd. 7, Nr. 12, S. e51177, Dez. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0051177.
- [57] W. Lee, H. Kim, S. Lee, S.-S. Yoo, und Y. A. Chung, „Creation of various skin sensations using pulsed focused ultrasound: Evidence for functional neuromodulation“, *Int. J. Imaging Syst. Technol.*, Bd. 24, Nr. 2, S. 167–174, 2014, doi: 10.1002/ima.22091.
- [58] H. Baek, K. J. Pahk, und H. Kim, „A review of low-intensity focused ultrasound for neuromodulation“, *Biomed. Eng. Lett.*, Bd. 7, Nr. 2, S. 135–142, Mai 2017, doi: 10.1007/s13534-016-0007-y.
- [59] G. Toccaceli, G. Barbagallo, und S. Peschillo, „Low-intensity focused ultrasound for the treatment of brain diseases: safety and feasibility“, *Theranostics*, Bd. 9, Nr. 2, S. 537–539, 2019, doi: 10.7150/thno.31765.
- [60] G. ter Haar, „Therapeutic applications of ultrasound“, *Eff. Ultrasound Infrasound Relev. Hum. Health*, Bd. 93, Nr. 1, S. 111–129, Jan. 2007, doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2006.07.005.
- [61] „Manipulation of Subcortical and Deep Cortical Activity in the Primate Brain Using Transcranial Focused Ultrasound Stimulation | Elsevier Enhanced Reader“. <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0896627319300467?to-ken=F5989F0FE872A0E84824C7841C63004F51BBAFEC3CD047629812E274827042666296B49F0769BB0C60F11026B0B3967C> (zugegriffen Juni 13, 2020).
- [62] B. Krasovitski, V. Frenkel, S. Shoham, und E. Kimmel, „Intramembrane cavitation as a unifying mechanism for ultrasound-induced bioeffects“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Bd. 108, Nr. 8, S. 3258–63, Jan. 01, 2011. doi: 10.1073/pnas.1015771108.
- [63] C. T. Dickson, J. Magistretti, M. Shalinsky, B. Hamam, und A. Alonso, „Oscillatory Activity in Entorhinal Neurons and Circuits: Mechanisms and Function“, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, Bd. 911, Nr. 1, S. 127–150, 2000, doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06723.x.
- [64] S.-S. Yoo u. a., „Focused ultrasound modulates region-specific brain activity“, *NeuroImage*, Bd. 56, Nr. 3, S. 1267–75, Jan. 01, 2011. doi: 10.1016/j.neuroimage.2011.02.058.
- [65] D. B. Headley und D. Paré, „Common oscillatory mechanisms across multiple memory systems“, *NPJ science of learning*, Bd. 2, Jan. 01, 2017. doi: 10.1038/s41539-016-0001-2.
- [66] T. T. G. Hahn, B. Sakmann, und M. R. Mehta, „Phase-locking of hippocampal interneurons’ membrane potential to neocortical up-down states“, *Nat. Neurosci.*, Bd. 9, Nr. 11, Art. Nr. 11, Nov. 2006, doi: 10.1038/nn1788.

-
- [67] R. Cossart, D. Aronov, und R. Yuste, „Attractor dynamics of network UP states in the neocortex“, *Nature*, Bd. 423, Nr. 6937. S. 283–8, Jan. 01, 2003. doi: 10.1038/nature01614.
 - [68] Jozsef Csicsvari, „Oscillatory Coupling of Hippocampal Pyramidal Cells and Interneurons in the Behaving Rat“.
 - [69] B. N. Lundstrom, C. Meisel, J. van Gompel, M. Stead, und G. Worrell, „Comparing spiking and slow wave activity from invasive electroencephalography in patients with and without seizures“, *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, Bd. 129, Nr. 5. S. 909–919, Jan. 01, 2018. doi: 10.1016/j.clinph.2018.02.006.
 - [70] F. P. Battaglia, G. R. Sutherland, und B. L. McNaughton, „Hippocampal sharp wave bursts coincide with neocortical “up-state” transitions“, *Learn. Mem.*, Bd. 11, Nr. 6, S. 697–704, Nov. 2004, doi: 10.1101/lm.73504.
 - [71] Igor Timofeev*, Francois Grenier, and Mircea Steriade, „Disfacilitation and active inhibition in the neocortex during the natural sleep-wake cycle: An intracellular study“.
 - [72] M. M. Zylla, X. Zhang, S. Reichinnek, A. Draguhn, und M. Both, „Cholinergic plasticity of oscillating neuronal assemblies in mouse hippocampal slices“, *PloS one*, Bd. 8, Nr. 11. S. 80718, Jan. 01, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0080718.
 - [73] L. Nobili a,b, *, M.G. Baglietto b, „Distribution of epileptiform discharges during nREM sleep in the CSWSS syndrome: relationship with sigma and delta activities“.
 - [74] J. L. Butler und O. Paulsen, „Hippocampal network oscillations - recent insights from in vitro experiments“, *Current opinion in neurobiology*, Bd. 31. S. 40–4, Jan. 01, 2015. doi: 10.1016/j.conb.2014.07.025.
 - [75] A. Hashimoto, T. Sawada, und K. Natsume, „The change of picrotoxin-induced epileptiform discharges to the beta oscillation by carbachol in rat hippocampal slices“, *Biophysics and physicobiology*, Bd. 14. S. 137–146, Jan. 01, 2017. doi: 10.2142/biophysico.14.0_137.
 - [76] V. Fischer, M. Both, A. Draguhn, und A. V. Egorov, „Choline-mediated modulation of hippocampal sharp wave-ripple complexes in vitro“, *Journal of neurochemistry*, Bd. 129, Nr. 5. S. 792–805, Jan. 01, 2014. doi: 10.1111/jnc.12693.
 - [77] G. Buzsáki und X.-J. Wang, „Mechanisms of gamma oscillations“, *Annual review of neuroscience*, Bd. 35. S. 203–25, Jan. 01, 2012. doi: 10.1146/annurev-neuro-062111-150444.
 - [78] A. N. J. Pietersen, P. D. Ward, N. Hagger-Vaughan, J. Wiggins, J. G. R. Jefferys, und M. Vreugdenhil, „Transition between fast and slow gamma modes in rat hippocampus area CA1 in vitro is modulated by slow CA3 gamma oscillations“, *The Journal of physiology*, Bd. 592, Nr. 4. S. 605–20, Jan. 01, 2014. doi: 10.1113/jphysiol.2013.263889.
 - [79] Simon B. Colling, Ian M. Stanford, Roger D. Traub, und John G. R. Jefferys, „Limbic Gamma Rhythms. I. Phase-Locked Oscillations in Hippocampal CA1 and Subiculum“.
 - [80] Miles A. Whittington, Ian M. Stanford *, Simon B. Colling *, John G. R. Jefferys* and Roger D. Traubtt, „Spatiotemporal patterns of γ frequency oscillations tetanically induced in the rat hippocampal slice“.
 - [81] L. L. Colgin, „Theta-gamma coupling in the entorhinal-hippocampal system“, *Current opinion in neurobiology*, Bd. 31. S. 45–50, Jan. 01, 2015. doi: 10.1016/j.conb.2014.08.001.
 - [82] T. J. Senior, J. R. Huxter, K. Allen, J. O’Neill, und J. Csicsvari, „Gamma oscillatory firing reveals distinct populations of pyramidal cells in the CA1 region of the hippocampus“, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, Bd. 28, Nr. 9. S. 2274–86, Jan. 01, 2008. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4669-07.2008.

- [83] Roger D. Traub*^{ftt}, Miles A. Whittington §, Simon B. Colling, György Buzsáki and John G. R. Jefferys, „Analysis of gamma rhythms in the rat hippocampus in vitro and in vivo.“
- [84] S. A. Weiss *u. a.*, „Ripples on spikes show increased phase-amplitude coupling in medial temporal lobe epilepsy seizure-onset zones“, *Epilepsia*, Bd. 57, Nr. 11. S. 1916–1930, Jan. 01, 2016. doi: 10.1111/epi.13572.
- [85] A. Ylinen *u. a.*, „Sharp wave-associated high-frequency oscillation (200 Hz) in the intact hippocampus: network and intracellular mechanisms“, *J. Neurosci.*, Bd. 15, Nr. 1, S. 30–46, Jan. 1995, doi: 10.1523/JNEUROSCI.15-01-00030.1995.
- [86] Aptara, „Distinct roles of GABAB1a- and GABAB1b-containing GABAB receptors in spontaneous and evoked termination of persistent cortical activity“.
- [87] T. Tominaga und Y. Tominaga, „Paired Burst Stimulation Causes GABAA Receptor-Dependent Spike Firing Facilitation in CA1 of Rat Hippocampal Slices“, *Frontiers in cellular neuroscience*, Bd. 10. S. 9, Jan. 01, 2016. doi: 10.3389/fncel.2016.00009.
- [88] Andrei S. Rosen and R. David Andrew, „Glucose concentration inversely alters neocortical slice excitability through an osmotic effect“.
- [89] S. Monteith, J. Snell, M. Eames, N. F. Kassell, E. Kelly, und R. Gwinn, „Transcranial magnetic resonance-guided focused ultrasound for temporal lobe epilepsy: a laboratory feasibility study“, *Journal of neurosurgery*, Bd. 125, Nr. 6. S. 1557–1564, Jan. 01, 2016. doi: 10.3171/2015.10.JNS1542.
- [90] Steffen Tretbar, „Schallfeldmessung“. Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik.
- [91] „scipy.stats.mannwhitneyu — SciPy v1.5.4 Reference Guide“.
<https://docs.scipy.org/doc/scipy/reference/generated/scipy.stats.mannwhitneyu.html#scipy.stats.mannwhitneyu> (zugegriffen Dez. 14, 2020).
- [92] „scipy.stats.wilcoxon — SciPy v1.5.4 Reference Guide“.
<https://docs.scipy.org/doc/scipy/reference/generated/scipy.stats.wilcoxon.html#scipy.stats.wilcoxon> (zugegriffen Dez. 14, 2020).
- [93] R. Zemankovics, S. Káli, O. Paulsen, T. F. Freund, und N. Hájos, „Differences in sub-threshold resonance of hippocampal pyramidal cells and interneurons: the role of h-current and passive membrane characteristics“, *The Journal of physiology*, Bd. 588, Nr. Pt 12. S. 2109–32, Jan. 01, 2010. doi: 10.1113/jphysiol.2009.185975.
- [94] W. J. Tyler, Y. Tufail, M. Finsterwald, M. L. Tauchmann, E. J. Olson, und C. Majestic, „Remote excitation of neuronal circuits using low-intensity, low-frequency ultrasound“, *PloS one*, Bd. 3, Nr. 10. S. 3511, Jan. 01, 2008. doi: 10.1371/journal.pone.0003511.
- [95] Fenella G. Pike, Ruth S. Goddard, Jillian M. Suckling, Paul Ganter, Narayanan Kasthuri und Ole Paulsen, „Distinct frequency preferences of different types of rat hippocampal neurones in response to oscillatory input currents“.
- [96] Yoshikazu Isomura, Anton Sirota, SimalO' zen, Sean Montgomery,1 Kenji Mizuseki,1, und Darrell A. Henze,1,4 and Gyo' rgy Buzsa' ki1,* , „Integration and Segregation of Activity in Entorhinal-Hippocampal Subregions by Neocortical Slow Oscillations“.
<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0896627306008221?to-ken=BBFAE8F10ED1FC4EB74E9D6A8E497CF77FA9D2BA56725A566F718F9800C2F9161113551C8EC06F0BFAD43959E1231D9B> (zugegriffen Juni 15, 2020).
- [97] Artur Luczak, Peter Bartho' , Stephan L. Marguet, Gyo' rgy Buzsa' ki, and Kenneth D. Harris*, „Sequential structure of neocortical spontaneous activity in vivo“.
- [98] Traub und R. et al., „A Possible Role for Gap Junctions in Generation of Very Fast EEG Oscillations Preceding the Onset of, and Perhaps Initiating, Seizures“.
- [99] Anatol Bragin, „Gamma (40-100 Hz) Oscillation in the Hippocampus of the Behaving Rat“.
- [100] A. Fisahn, A. Contractor, R. D. Traub, E. H. Buhl, S. F. Heinemann, und C. J. McBain,

- „Distinct roles for the kainate receptor subunits GluR5 and GluR6 in kainate-induced hippocampal gamma oscillations“, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, Bd. 24, Nr. 43. S. 9658–68, Jan. 01, 2004. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2973-04.2004.
- [101] D. A. Rempe, E. H. Bertram, J. M. Williamson, und and E. W. Lothman, „Interneurons in Area CA1 Stratum Radiatum and Stratum Oriens Remain Functionally Connected to Excitatory Synaptic Input in Chronically Epileptic Animals“.
- [102] Dietmar Schmitz, Ruth M. Empson, and Uwe Heinemann, „Serotonin Reduces Inhibition via 5HT₂ Receptors in Area CA1 of Rat Hippocampal Slices in vitro“.
- [103] Maria V. Sanchez-Vives^{1,2} and David A. McCormick¹, „Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex“.
- [104] Y. Sato, S. M. Wong, Y. Iimura, A. Ochi, S. M. Doesburg, und H. Otsubo, „Spatiotemporal changes in regularity of gamma oscillations contribute to focal ictogenesis“, *Scientific reports*, Bd. 7, Nr. 1. S. 9362, Jan. 01, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-09931-6.
- [105] L. V. Colom, A. García-Hernández, M. T. Castañeda, M. G. Perez-Cordova, und E. R. Garrido-Sanabria, „Septo-hippocampal networks in chronically epileptic rats: potential antiepileptic effects of theta rhythm generation“, *Journal of neurophysiology*, Bd. 95, Nr. 6. S. 3645–53, Jan. 01, 2006. doi: 10.1152/jn.00040.2006.
- [106] B. G. Liptak, *Instrument Engineers' Handbook, Volume Two: Process Control and Optimization*. CRC Press, 2018.
- [107] B. Tahvildari, M. Wölfel, A. Duque, und D. A. McCormick, „Selective functional interactions between excitatory and inhibitory cortical neurons and differential contribution to persistent activity of the slow oscillation“, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, Bd. 32, Nr. 35. S. 12165–79, Jan. 01, 2012. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1181-12.2012.
- [108] K. Mizuseki, K. Diba, E. Pastalkova, und G. Buzsáki, „Hippocampal CA1 pyramidal cells form functionally distinct sublayers“, *Nature neuroscience*, Bd. 14, Nr. 9. S. 1174–81, Jan. 01, 2011. doi: 10.1038/nn.2894.
- [109] K. J. Bender und L. O. Trussell, „Axon initial segment Ca²⁺ channels influence action potential generation and timing“, *Neuron*, Bd. 61, Nr. 2, S. 259–271, Jan. 2009, doi: 10.1016/j.neuron.2008.12.004.

Danksagung

Zunächst gilt mein Dank Prof. Rüdiger Köhling sowie Prof. Ulrich Stephani, die in wissenschaftlicher, finanzieller sowie administrativer Hinsicht die hier vorliegende Arbeit ermöglicht haben. Erst durch ihre unermüdliche Unterstützung konnte ich die Arbeit in der gegebenen Zeit fertigstellen. Besonderer Dank gilt ebenfalls Herrn Steffen Tretbar vom Fraunhofer-Institut St. Ingbert, der die Messkammer mit Ultraschallwandler entwickelt und mir für meine Messungen zur Verfügung gestellt hat. Auch den Mitarbeitern des Oscar Langendorff Instituts für Physiologie Rostock, u.a. Dr. Heerdegen, möchte ich für ihre langjährige und ausdauernde Unterstützung herzlich danken. Die immer wiederkehrenden, aufbauenden Kommentare von Katrin Porath sowie Tina Sellmann haben mich stets positiv durch meine Laborzeit begleitet. Ein besonderer Dank gilt meinem Freund Benjamin Kehrer, der mich auf der Zielgeraden dieser Dissertation stets mit einem Lächeln begleitet hat. Seine positive Art sowie sein unermüdlicher Optimismus haben immer wieder Sonne in die langen Nächte des Schreibens gebracht – und hin und wieder auch das Käsebrot als kulinarisches Highlight des Tages verhindert. Ihn als Weggefährten zu wissen, ist ein unglaubliches Geschenk, das in Worte zu fassen schwerfällt.

Auch meinem Freund Hannes sowie seiner Frau Lisa möchte ich ganz besonders danken. Gemeinsam mit ihrer Tochter Anna haben sie durch ihren unermüdlichen Zuspruch und ihre positive Art nicht nur immer wieder neue Denkanstöße vermittelt, sondern auch für viele positive Momente gesorgt. Die entspannte Plauderei bei einem Gläschen Wein am Abend mit meinem besonderen Freund Hannes, sowie das gemeinsame Yoga, haben mich stets positiv beeinflusst und offen für allerlei Neues gehalten. Es ist stets ein Gewinn, so gute Freunde zu haben, die einen im Leben begleiten, egal wohin es einen verschlägt.

Auch meiner Familie möchte ich herzlich danken. Ihr unermüdlicher Zuspruch hat mich stets unterstützt und neben den regelmäßigen Erinnerungen meiner Eltern, dass die Dissertation weiterhin auf meinem Schreibtisch ruht und auf Fertigstellung wartet, haben sie mir auch stets die wesentlichen Dinge im Leben vor Augen geführt und so für einen entspannten und fröhlichen Ausgleich im Arbeitsalltag gesorgt.

Zu guter Letzt möchte ich auch Prof. Meybohm, Prof. Brack sowie Prof. Rittner des Universitätsklinikums Würzburg danken. Durch ihre zuversichtliche Art sowie meiner - durch sie erfolgten - Anstellung als clinician scientist haben sie mich dazu ermutigt, diese Dissertation schnellstmöglich fertigzustellen und mir so einen neuen Abschnitt in meiner weiteren Ausbildung ermöglicht.

Es gibt noch viele weitere Personen, denen ich an dieser Stelle danken möchte und danken sollte. Da die Aufzählung jedoch nie vollständig sein wird, möchte ich an dieser Stelle einen allgemeinen Dank an alle richten, die mich während all der Zeit unterstützt haben, auch wenn sie nicht explizit namentlich erwähnt worden sind.